

Potensi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Sebagai *Frothing Agent* pada Proses Konsentrasi Flotasi

Tri Wahyuningsih¹, Edy Sanwani², dan Siti Khodijah Chaerun^{2,3}

¹Program Studi Teknik Metalurgi, Jurusan Teknik Pertambangan, Fakultas Teknologi Mineral, UPN “Veteran” Yogyakarta, Jl. SWK 104 (Lingkar Utara) Condongcatur Yogyakarta Indonesia 55283

²Prodi Teknik Metalurgi, Fakultas Teknik Pertambangan dan Perminyakan, Institut Teknologi Bandung (ITB)

³Laboratorium Geomikrobiologi, Biomining & Biokorosi, Pusat Penelitian Biosains dan Bioteknologi, Institut Teknologi Bandung (ITB), Jl. Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

Korespondensi penulis: tri.wahyuningsih@upnyk.ac.id

Abstrak. Perbedaan sifat permukaan mineral pada proses konsentrasi flotasi merupakan syarat utama untuk memisahkan mineral berharga dari mineral pengotornya. Perbedaan sifat permukaan mineral didapatkan dengan menambahkan reagen kimia yang bisa membuat permukaan salah satu mineral menjadi hidrofobik sementara mineral lain memiliki sifat hidrofilik. Selain itu penambahan reagen lain juga diperlukan untuk menciptakan suatu kondisi agar proses flotasi dapat berlangsung dengan baik. Penggunaan reagen kimia anorganik ini seringkali mempunyai efek yang kurang baik untuk lingkungan, oleh karena itu penggunaan reagen kimia dicoba digantikan dengan peranan mikroba. Proses pengolahan mineral sulfida pada umumnya dilakukan dengan konsentrasi flotasi dengan membuang unsur pengotor utama berupa mineral pirit. Untuk mengevaluasi potensi bakteri sebagai bioregen, maka dilakukan studi interaksi bakteri penghasil biosurfaktan *Citrobacter* sp. (kode isolat bakteri BS-5) dengan mineral pirit. Tegangan permukaan larutan hasil interaksi mineral dan bakteri ini dikarakterisasi dan diamati secara periodik untuk mengetahui potensi bakteri sebagai agen pembuih (*frothing agent*) pada proses flotasi. Hasil pengukuran *surface tension* pada awal interaksi menunjukkan nilai 52 mN/m, yang mengindikasikan bahwa bakteri *Citrobacter* sp. mampu menghasilkan bioreagen (*frothing agent*) yang dapat digunakan untuk proses flotasi yang lebih ramah lingkungan.

Kata kunci: Biosurfaktan, pirit, *frothing agent*, *surface tension*.

Abstract. The different properties of mineral surfaces in the flotation concentration process are the main requirements for separating valuable minerals from their impurity minerals. Differences in mineral surface properties are obtained by adding chemical reagents that can make the surface of one mineral become hydrophobic while other minerals have hydrophilic properties. In addition, the other reagents are also needed to create a condition so that the flotation process can undergo properly. Using inorganic chemical reagents often has adverse effects on the environment. Therefore, the use of chemical reagents will be replaced by the role of microbes. The process of processing sulfide minerals is generally carried out by flotation concentration by removing the main impurities that are pyrite minerals. To evaluate the potential of bacteria as a bioreagent, a study was conducted on the interaction of a biosurfactant-producing bacterium *Citrobacter* sp. (designated BS-5) with pyrite minerals. The solution surface tension resulting from the interaction of minerals and bacteria was characterized and periodically observed to determine the potential of the bacterium as a frothing agent in the flotation process. The results of surface tension measurements at the beginning of the interaction showed a value of 52 mN/m, indicating that the bacterium was able to produce bioreagent (*frothing agent*), which could be used for a more environmentally friendly flotation process.

Keywords: Biosurfactant, pyrite, *frothing agent*, *surface tension*

A. Pendahuluan

Upaya penerapan pengolahan mineral yang lebih ramah lingkungan telah dimulai seiring dengan kemajuan penerapan bioteknologi pada berbagai bidang antara lain untuk bioremediasi [1, 2, 3], *soil-water treatment* [4], biodesulfurisasi sulfur organik pada batubara [5], dll. Demikian juga pada

proses konsentrasi flotasi, penerapan bioteknologi mulai banyak dilakukan penelitian tentang pemanfaatan mikroba terutama dari jenis bakteri penghasil biosurfaktan [6,7,8]. Hasil enzim dan metabolit yang disekresikan oleh bakteri dapat memiliki interaksi spesifik dengan mineral baik secara langsung maupun tidak langsung [9, 10]. Beberapa peneliti telah banyak mempelajari

pemisahan selektif pada mineral dengan bakteri dari genus *Bacillus* [11] maupun dari jenis bakteri *Gram* positif *Acidithiobacillus ferrooxidans* [12] tanpa menggunakan reagen kimia anorganik. Aspek fundamental proses bioflotasi melalui interaksi dengan mikroorganisme [6, 7, 8, 13] semakin menarik untuk dilakukan penelitian lanjutan sehingga proses selektifitas konsentrasi pada pengolahan mineral semakin meningkat dan lebih ramah lingkungan [9, 11]. Sifat bioreagen yang dihasilkan oleh aktifitas enzim bakteri dapat berfungsi sebagai biosurfaktan yang mampu memperkecil tegangan permukaan suatu larutan yang didukung oleh fungsi ganda (permukaan hidrofilik dan hidrofobik) [14]. Interaksi mineral dengan bakteri [6, 7, 8, 11] telah memberikan peluang untuk pemanfaatan bakteri dan hasil metabolisme bakteri pada proses bioflotasi yang lebih ramah lingkungan. Aktivitas bakteri selama masa interaksi mampu mengubah keasaman pH larutan [10, 13, 15] yang dapat berpengaruh pada saat proses kondisioning maupun proses konsentrasi flotasi. Untuk mengevaluasi potensi bakteri sebagai bioreagen, maka dilakukan studi interaksi bakteri *Gram* negatif penghasil biosurfaktan *Citrobacter* sp. (kode isolat bakteri BS-5) dengan mineral pirit. Tegangan permukaan larutan hasil interaksi mineral dan bakteri ini dikarakterisasi dan diamati secara periodik untuk mengetahui potensi bakteri sebagai agen pembuih (*frothing agent*) pada proses flotasi.

B. Material dan Metode

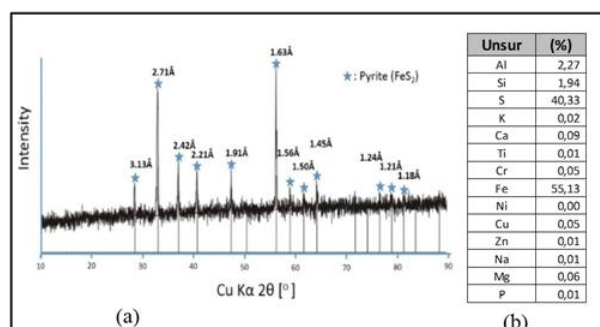
Mineral pirit

Mineral pirit yang digunakan pada penelitian mempunyai kemurnian tinggi (>90%) yang direduksi ukurannya menggunakan *grinding ceramic ballmill* (-200+325 mesh). Sampel disimpan dalam plastik dan dimasukkan kedalam desikator untuk mencegah oksidasi. Karakterisasi mineral pirit dilakukan dengan *X-ray powder diffractometry* (XRD) yang menunjukkan kemurnian tinggi dari pirit (FeS_2) (Gambar 1a) serta komposisi unsur hasil *X-ray fluorescence* (XRF) pirit (FeS_2) yang ditunjukkan pada Gambar 1b.

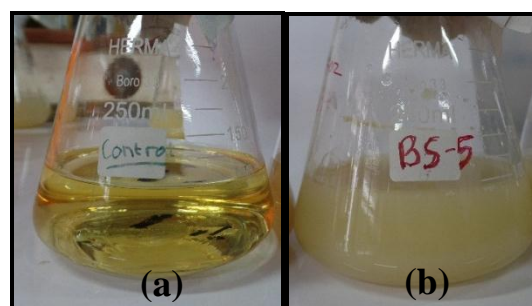
Bakteri dan media tumbuh

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Gram* negatif strain baru *Citrobacter* sp.

dengan kode isolat bakteri BS-5 yang dapat hidup pada daerah yang mempunyai kandungan sulfur tinggi. Selain dapat memproduksi biosurfaktan, bakteri ini juga dapat mengoksidasi sulfur. Media tumbuh bakteri *Citrobacter* sp. adalah media *Luria-Bertani Broth* (LB broth) dengan komposisi 10 g/L *peptone*, 5 g/L *yeast extract*, 10 g/L NaCl yang ditambah dengan 0,25 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 0,5 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Media LB yang akan diinokulasi bakteri dilakukan sterilisasi dengan *autoclave* (tekanan 1,5 Psi, suhu 120°C , selama 15-20 menit) yang bertujuan untuk membunuh organisme yang ada. Setelah media dingin (Gambar 2a) dilakukan inokulasi bakteri murni (5% v/v) dan selanjutnya dilakukan inkubasi selama 3-5 hari dengan *Erlenmeyer rotary shaker* (kondisi aerob, 150 rpm, suhu ruang). Setelah 3 hari inkubasi, pertumbuhan bakteri mencapai 80% fase eksponensial dan bakteri siap untuk digunakan pada proses interaksi dengan mineral (Gambar 2b).



Gambar 1. Hasil karakterisasi sampel pirit dengan XRD (a) dan XRF (b)



Gambar 2. Media tumbuh *LB broth* (a), kultur bakteri *Citrobacter* sp. (kode isolat bakteri BS-5) setelah 3 hari inkubasi (b).

Proses interaksi bakteri dan mineral pirit

Interaksi bakteri dengan mineral pirit dilakukan setelah didapatkan 80% fase eksponensial dari pertumbuhan bakteri yaitu pada hari ke-3. Setelah dipanen, bakteri diaplikasikan dengan mencampurkan mineral pirit (kondisi steril) dengan ukuran -200+325 mesh pada media LB modifikasi pada *batch system* dalam labu Erlenmeyer volume 1 liter (Gambar 3). Percobaan *batch system* ini dilakukan dengan *persen solid* yang tinggi (25% w/v) yang diinokulasikan bakteri (10% v/v) pada media tumbuh. Pada proses interaksi, kultur dilakukan inkubasi selama 30 hari pada *rotary shaker* (150 rpm, suhu ruang) pada kondisi aerob. Pengambilan sampel dilakukan pada rentang waktu tertentu secara periodik (pada hari ke 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 30) pada kondisi steril.



Gambar 3. Kultur interaksi bakteri *Citrobacter* sp. dengan mineral pirit

Selanjutnya dari sampling interaksi bakteri dengan mineral pirit yang sudah diambil dilakukan analisis antara lain analisis pH larutan, jumlah sel bakteri (CFU/ml), *surface tension*, dan aktivitas enzimatis bakteri (FDA).

Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan secara periodik pada kultur interaksi bakteri dan mineral pirit dengan menggunakan digital pH meter *Lutron tipe pH-208*.

Perhitungan jumlah sel bakteri

Perhitungan jumlah koloni bakteri dengan satuan CFU (colony-forming unit) per mL dilakukan diatas media padat (*agar plate*) dengan komposisi yang sama dengan media LB modifikasi yang ditambah dengan 2% bahan *agar*. Metode yang dipakai menggunakan metode tuang (*pour plate counting*) dengan menuangkan 1 ml inokulum ke larutan fisiologis steril (NaCl 0,85%) pada tabung

reaksi dan dilakukan pencampuran dengan *vortex* selama ± 1 menit.

Pengukuran *surface tension*

Pengukuran *surface tension* dilakukan pada inkubasi hari ke 0, 3, 7, 14, 21, 30 dengan mengambil $\pm 30-50$ mL larutan hasil interaksi dengan mineral. Pengukuran ini menggunakan *digital ring tensiometer K10ST Kruss (ring method)*. Pengukuran *surface tension* dilakukan pada suhu ruang (Gambar 4). Semua pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk mendapatkan nilai rata-rata dari pengukuran tersebut.



Gambar 4. *Digital ring tensiometer K10ST Kruss*

Pengukuran aktivitas enzim (FDA, *Fluorescein Diacetate*)

Pengukuran aktivitas enzimatis bakteri (FDA) dapat divisualisasikan dengan menggunakan mikroskop *fluorescence* atau dengan menggunakan alat *spektrofotometer Genesys 10S UV-Vis* dengan mengukur absorbansinya. Larutan yang akan diukur dimasukkan dalam *cuvette* yang kemudian dibaca nilai absorbansinya pada panjang gelombang 492 nm (Gambar 5). Pengukuran ini dilakukan sesudah interaksi antara bakteri dengan mineral.

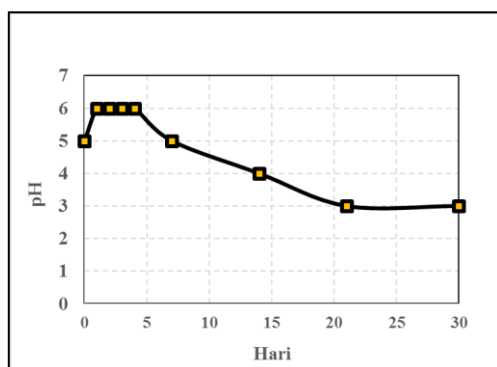


Gambar 5. *Spektrofotometer Genesys 10S UV-Vis*

C. Hasil dan Analisis

Efek interaksi bakteri dan mineral terhadap perubahan pH larutan

Perubahan pH larutan pada kultur interaksi bakteri dengan mineral pirit menunjukkan kecenderungan semakin asam setelah hari ke 4.



Gambar 6. Perubahan pH larutan interaksi bakteri *Citrobacter* sp. dengan mineral pirit

Pertumbuhan bakteri dan aktivitas bakteri selama masa inkubasi mampu mengubah keasaman pH larutan. Kecenderungan keasaman larutan yang semakin rendah hingga pH 3 (Gambar 6) disebabkan oleh aktifitas bakteri yang dapat mengoksidasi besi (Fe) dan sulfur (S) yang selanjutnya dapat menghasilkan asam sulfat sehingga dapat menurunkan pH larutan yang menghasilkan ion H^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} dan SO_4^{2-} pada kultur interaksinya. Hasil pH larutan interaksi bakteri dengan mineral pirit mengalami penurunan dari kondisi netral ke pH asam (pH 3) seiring dengan lamanya masa inkubasi.

Efek interaksi bakteri dan mineral terhadap jumlah bakteri yang hidup

Hasil tingkat kekeruhan (dibandingkan dengan larutan awal media sebelum diinokulasikan bakteri) dapat menunjukkan bahwa bakteri mampu tumbuh dengan baik (Gambar 2). Jumlah bakteri pada 80% fase eksponensial mencapai $6,5 \times 10^{10}$ CFU/mL. Fase pertumbuhan bakteri sebelum dilakukan interaksi dengan mineral menghasilkan kurva tumbuh yang teratur, namun setelah dilakukan adaptasi dengan mineral menghasilkan jumlah bakteri yang sangat sedikit setelah interaksi dengan pirit (Tabel 1). Koloni bakteri *Citrobacter* sp. yang teramati pada plating agar dapat dilihat

pada Gambar 7b. Bakteri pada fase eksponensial sebelum diadaptasikan dengan mineral mempunyai jumlah yang sangat banyak, namun setelah diadaptasikan dengan mineral pirit pada hari ke-0 (saat pencampuran) jumlah bakteri yang hidup mengalami penurunan yang drastis bahkan hampir semua bakteri mengalami kematian. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi pirit yang tinggi (25% solid) yang bersifat racun bagi bakteri. Meskipun demikian didalam kultur interaksi bakteri *Citrobacter* sp. dengan pirit masih terdapat beberapa bakteri hidup (Gambar 7c) yang dapat bertahan pada kondisi ekstrim dan mampu melakukan aktivitas perbanyak sel lagi pada hari ke-7. Pada hari ke-7 hingga ke-30 tingkat konsentrasi jumlah bakteri lebih banyak daripada saat awal interaksi dan dihasilkan pH larutan lebih asam.

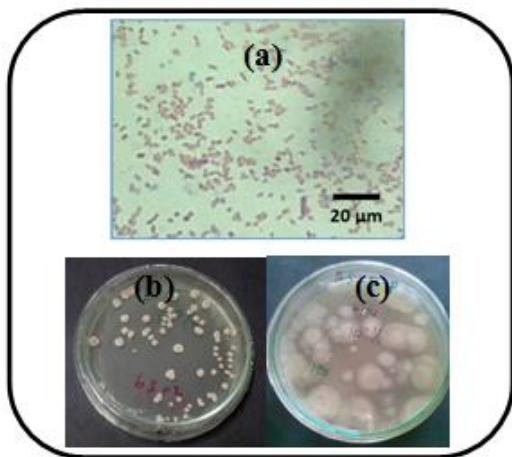
Tabel 1. Jumlah koloni bakteri *Citrobacter* sp. pada kultur interaksi dengan mineral pirit

Jumlah Koloni Bakteri	
Hari	(cfu/ml)
0	0
1	0
2	0
3	605
4	0
7	1360
14	1500
21	265
30	285

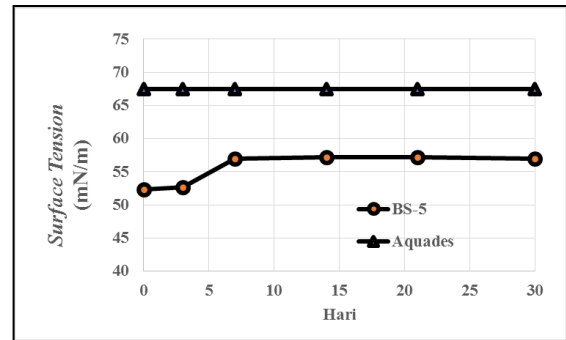
Efek interaksi bakteri dan mineral terhadap nilai *surface tension*

Pengukuran *surface tension* bertujuan untuk mengetahui adanya indikasi biosurfaktan yang terbentuk akibat reaksi interaksi dengan bakteri, dimana kehadiran biosurfaktan ini mampu berpotensi sebagai *fothing agent* yang membuat tegangan permukaan larutan menjadi lebih rendah dan lebih stabil (gelembung yang dihasilkan tidak mudah pecah pada saat flotasi). Adanya zat terlarut pada cairan dapat menaikkan atau menurunkan tegangan permukaan. Zat-zat yang berfungsi memperkecil tegangan permukaan cairan disebut surfaktan. Surfaktan yang larut dalam air banyak digunakan sebagai zat pembasah, zat pembusa (detergen), zat pengemulsi, reagen flotasi, pencegah korosi, dan lain-lain. Surfaktan menurunkan tegangan permukaan air dengan mematahkan ikatan-ikatan hidrogen pada permukaan. Hal ini dilakukan

dengan menaruh gugus hidrofiliknya pada permukaan air dan gugus hidrofobiknya menjauhi permukaan air, sehingga surfaktan merupakan suatu molekul yang sekaligus memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik. Aktifitas surfaktan diperoleh karena sifat ganda dari molekulnya. Nilai *surface tension* larutan kultur interaksi mineral pirit dengan bakteri *Citrobacter* sp. (Gambar 8) menghasilkan nilai yang lebih kecil daripada nilai larutan pembanding awal yang diukur dengan aquades (67 mN/m). Semua nilai *surface tension* larutan kultur interaksi menghasilkan nilai yang lebih kecil dari *surface tension* air (71 mN/m). Hal ini membuktikan bakteri *Citrobacter* sp. dan hasil metabolitnya berpotensi mampu menurunkan tegangan permukaan air dan dapat diaplikasikan sebagai reagen flotasi (*biofrother*). Dari hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa selama proses interaksi dengan mineral, bakteri mampu menghasilkan senyawa kimia yang bertindak sebagai biosurfaktan. Nilai tegangan permukaan paling kecil (52 mN/m) dihasilkan pada saat awal proses interaksi, sedangkan bakteri pada awal interaksi dengan pirit hampir tidak ada yang hidup. Hal ini menandakan peranan biosurfaktan hasil metabolisme bakteri lebih berpengaruh pada kestabilan nilai tegangan permukaan daripada pengaruh bakteri itu sendiri.



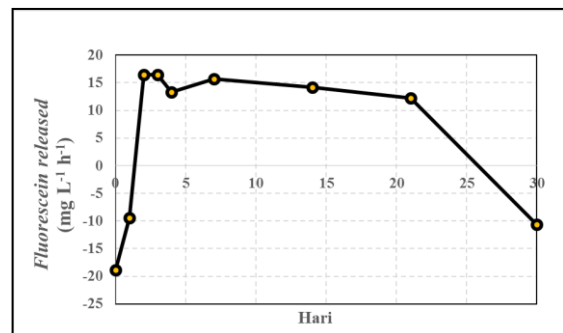
Gambar 7. Foto bakteri *Citrobacter* sp. (a), koloni bakteri *Citrobacter* sp. yang ditumbuhkan pada media *agar plate* LB modifikasi selama 24 jam pada suhu 25°C (b), koloni bakteri *Citrobacter* sp. yang diadaptasikan dengan mineral pirit (c).



Gambar 8. Nilai *surface tension* larutan interaksi bakteri *Citrobacter* sp. dengan mineral pirit

Efek interaksi bakteri dan mineral terhadap hasil aktivitas enzim mikroba

Pengukuran *fluorescein diacetate* (FDA) memberikan informasi tentang aktivitas enzimatik mikroba. Nilai FDA ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) hasil aktivitas enzimatik mikroba pada kultur interaksi mineral pirit dengan bakteri *Citrobacter* sp. tinggi pada hari ke 2, 3, dan 4. Pada saat awal inokulasi semua bakteri menunjukkan aktivitas enzim yang rendah, hal ini karena banyaknya bakteri yang mati akibat dari konsentrasi pirit yang tinggi. Bakteri *Citrobacter* sp. yang mati dan tertinggal pada kultur menyebabkan adanya aktivitas enzim semakin meningkat sehingga hal ini yang menyebabkan nilai FDA pada kultur menjadi tinggi. Meskipun demikian, didalam kultur interaksi masih terdapat beberapa bakteri hidup yang mampu melakukan aktivitas perbanyakan sel. Kecenderungan turunnya nilai FDA setelah hari ke-21 disebabkan oleh jumlah bakteri yang semakin sedikit (Gambar 9).



Gambar 9. Nilai FDA hasil interaksi bakteri *Citrobacter* sp. dengan mineral pirit

D. Kesimpulan

Biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Citrobacter* sp. menyebabkan penurunan tegangan permukaan pada larutan. Hal ini menunjukkan bahwa produk metabolit bakteri yang dihasilkan dapat berpotensi sebagai *frothing agent* (*biofrother*).

E. Ucapan Terimakasih

Terimakasih penulis sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat (LPPM), Institut Teknologi Bandung.

F. Daftar Pustaka

- [1] Chaerun, S.K., Tazaki, K., Asada, R., and Kogure, K., (2004). *Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria*. *Environment International* 30, p 911-922.
- [2] Chaerun, S.K., dan Tazaki, K. (2005). *How kaolinite plays an essential role in remediating oil polluted seawater*. *Clay Minerals* 40, p 481-491
- [3] Chaerun, S.K., Tazaki, K., and Okuno, M., (2013). *Montmorillonite mitigates the toxic effect of heavy oil on hydrocarbon-degrading bacterial growth: implications for marine oil spill bioremediation*. *Clay Minerals* 48, p 639-654.
- [4] Catherine, N. Mulligan (2005). *Environmental applications for biosurfactants*. *Environmental Pollution*, 133, 183-198.
- [5] Paisal, Y. (2015): *Biodesulfurisasi Sulfur Organik pada Batubara dengan Metode Bioproses Multitahap*, Disertasi Program Doktor, Institut Teknologi Bandung.
- [6] Sanwani, E., Chaerun, S.K., Mirahati, R.Z., Wahyuningsih, T. (2016). *Bioflotation: Bacteria Mineral Interaction for Ecofriendly and Sustainable Mineral Processing*. *Procedia Chemistry* 19, 666-672.
- [7] Sanwani, E., Wahyuningsih, T., Chaerun, S.K. (2015). *Assessment of surface properties of silica-bacterial cell complex: a potential application for silicate bioflotation processes*. *Advanced Materials Research*, Vol. 1130, pp 515-518.
- [8] Sanwani, E., Wahyuningsih, T., Chaerun, S.K. (2015). *A biosurfactant-producing and sulfur-oxidizing bacterium: its potential as eco-friendly bioreagents for bioflotation*. *Proceedings of Colloquium R & D Centre for Mineral and Coal Technology* (Tekmira), Bandung.
- [9] Balasubramanian, V., Ravishankar, H., dan Subramanian, S. (2012). *A Novel Property of DNA – as a Bioflotation Reagent in Mineral Processing*. *PLoS ONE*, Volume 7 Issue 7 e39316.
- [10] Sharma, P.K. (2001). *Surface Studies Relevant to Microbial Adhesion and Bioflotation of Sulphide Minerals*. Disertasi Program Doktor, Division of Mineral Processing Department of Chemical and Metallurgical Engineering, Luleå University of Technology, Luleå, Sweden, 37, ISSN 1402-1544.
- [11] Sarvamangala, H., Natarajan, K.A., dan Girisha, S.T. (2013). *Microbially-induced pyrite removal from galena using Bacillus subtilis*. *International Journal of Mineral Processing*, 120, 15-21.
- [12] Mehrabani, J.V., Noaparast, M., Mousavi, S.M., Dehghan, R., Rasooli, E., dan Hajizadeh, H. (2010). *Depression of pyrite in the flotation of high pyrite low-grade lead-zinc ore using Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Minerals Engineering* 23, 10-16.
- [13] Nagaoka, T., Ohmura, N., dan Hiroshi, S. (1999): *A Novel Mineral Flotation Process Using Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3588-3593.
- [14] Banat, I.M., Makkar, R.S., dan Cameotra, S.S. (2000): *Potential commercial applications of microbial surfactants*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, 495-508.
- [15] Devasia, P., Natarajan, K.A., Sathyanarayana, D.N., dan Ramananda Rao G. (1993): *Surface Chemistry of Thiobacillus ferrooxidans Relevant to Adhesion on Mineral Surfaces*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4051-4055.
- [16] Antonio, G. Merma, Maurício, L. Torem, José J.V. Morán, dan Marisa B.M. Monte (2013): *On the fundamental Aspects of Apatite and Quartz Flotation Using a Gram Positive Strain as a Bioreagent*. *Minerals Engineering* 48, 61-67.