

APLIKASI TEKNOLOGI HIJAU UNTUK PEMANTAUAN KUALITAS LINGKUNGAN BERBASIS STRUKTUR KOMUNITAS MIKROBA

Application of Green Technology for the Environmental Quality Monitoring Based on Microbial Community Structure

Muhammad Hanif

Pusat Teknologi Lingkungan
Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Gedung 820 Geostech. Kawasan Puspiptek, Banten 15314
E-mail: muhammad.hanif@bppt.go.id

Diterima: 05 September 2013; Dikoreksi: 22 September 2013; Disetujui: 03 oktober 2013

Abstract

Microbial community structure plays a significant role in the environmental quality monitoring. The development of a superior analytical strategy for the characterization of microbial community structure is an ongoing challenge. Respiratory quinone (RQ) profile analysis is one of the most widely used culture-independent tools for characterizing microbial community structure. This study was aimed to apply the supercritical fluid extraction (SFE) technology as a green technology for the determination the structure of microbial quinone communities in the wastewater treatment plant (WWTP) sludge. A statistical experimental design was used in the present study to optimize the SFE conditions. A Ultra performance liquid chromatography (UPLC) was applied to the simultaneous determination of ubiquinones (UQ) and menaquinones (MK). Supercritical carbon dioxide (scCO₂) extraction with the solid-phase cartridge trap proved to be a more effective and rapid method for extracting RQ, compared to a conventional organic solvent extraction method. This methodology leads to a successful analytical procedure that involves a significant reduction in the complexity and sample preparation time. The optimized SFE methodology was also demonstrated to characterize microbial communities based on the RQ profile for a variety of environmental samples such as soil, pond, river sediment, and digested sludge.

Keywords: *green technology, supercritical fluid extraction, respiratory quinone, microbial community structure, environmental monitoring*

Abstrak

Struktur komunitas mikroba memiliki peran yang penting dalam pemantauan kualitas lingkungan. Strategi pengembangan metode analitis yang handal untuk mengkarakterisasi struktur komunitas mikroba masih merupakan sebuah tantangan. Analisis profil respirasi kuinon (RK) merupakan salah satu metode identifikasi mikroba tanpa kulturisasi yang telah luas digunakan untuk mengkarakterisasi struktur komunitas mikroba. Studi ini bertujuan untuk mengaplikasikan teknologi ekstraksi fluida superkritis (EFS) sebagai sebuah teknologi hijau untuk determinasi struktur komunitas mikroba kuinondalam lumpur IPAL. Statistik desain percobaan digunakan dalam studi ini untuk mengoptimasi kondisi EFS, dan mengeksplorasi hubungan antara beberapa peubah dan satu atau lebih peubah respon. Kromatografi cairan ultra performansi (KCUP) dilengkapi detektor foto *diode array* digunakan untuk determinasi secara simultan ubikuinon (UK) dan menakuinon (MK). Ekstraksi superkritis berfluida CO₂ dengan perangkat kartridg fase padat terbukti lebih efektif dan cepat untuk mengekstraksi RK₂ dibandingkan metode konvensional dengan pelarut organik. Keberhasilan prosedur analitis dari metode ini dibuktikan dengan adanya pengurangan signifikan dari kompleksitas prosedur yang gunakan dan penurunan waktu preparasi sampel. Hasil optimalisasi metode EFS ini juga diuji sensitifitas nya dalam mengkarakterisasi komunitas mikroba berbasis profil kuinon pada berbagai sampel seperti tanah, air kolam, sedimen sungai, lumpur digesi anaerob. Metode ini dapat menjadi metode rutin dalam pemantauan struktur komunitas mikroba di lingkungan.

Kata kunci: teknologi hijau, ekstraksi fluida superkritis, respirasi kuinon, struktur komunitas mikroba; pemantauan lingkungan

1. PENDAHULUAN

Mikroorganisme memiliki peranan yang penting dalam degradasi kontaminan dan proses daur nutrisi. Untuk memahami proses tersebut, studi-studi mengenai struktur komunitas mikroba telah banyak mendapat perhatian serius. Struktur komunitas mikroba didefinisikan sebagai jumlah, keberagaman dan fungsi mikroorganisme yang terlibat dalam sebuah sistem atau proses. Pengetahuan tentang struktur komunitas mikroba telah digunakan untuk mengoptimalkan unjuk kerja dari instalasi pengolahan air limbah (IPAL), proses pembuatan kompos, dan proses digesi anaerob [12,14,15].

Pada saat ini, kemajuan metodologi untuk menganalisis komunitas mikroba dari berbagai jenis sampel telah memungkinkan kita untuk mengetahui secara lebih detail komposisi dan fungsi komunitas mikroba tersebut. Namun, pengembangan dan penerapan metode yang lebih handal untuk memperoleh pemahaman secara komprehensif tentang struktur komunitas mikroba masih merupakan tantangan [4].

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk karakterisasi komunitas mikroba adalah analisis respirasi kuinon (RK). Analisis komposisi RK adalah salah satu teknik kultur tanpa isolasi mikroba untuk karakterisasi struktur komunitas mikroba dan dapat memberikan struktur detail dari komunitas dan keberagamannya [2,7]. Struktur dan keberagaman komunitas mikroba dapat diindikasikan dengan komposisi kuinon karena setiap mikroorganisme mengandung sebuah spesies kuinon utama. Kuinon umumnya mewakili fraksi mol untuk setiap tipe kuinon. Perubahan komunitas mikroba dalam kultur mikroba campuran dapat secara efektif dikuantifikasi menggunakan profil kuinon dan digunakan untuk mengkaji kualitas lingkungannya. Tabel 1 menunjukkan interpretasi dari tipe kuinon dan indikator mikroorganismenya [2,10].

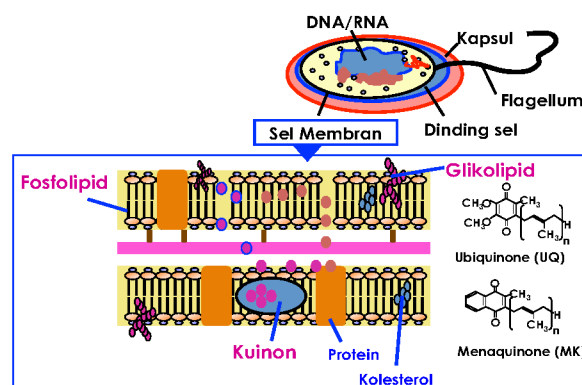
Tabel 1. Interpretasi dari berbagai tipe kuinon.

Tipe Kuinon	Biomarka
UQ-6 ~ UQ-9	Yeast
UQ-9, UQ-10(H ₂), UQ-10(H ₄)	Jamur
MK-n, MK-n(Hx)	
UQ-10	(Alpha) proteobacteria
UQ-8	(Beta) proteobacteria
UQ-8, UQ-9	(Gamma) proteobacteria
MK-n (n<8)	(Delta) proteobacteria
MK-n (n<8)	Low G+C, Gram Positive
MK-n (n<8)	Green sulfur bacteria
MK-n (n<8)	Cytophagales group
MK-n	Non-sulfur bacteria
MK-n (n<8)	Thermus group
MK-n (n>9), MK-n(Hx)	Actinobacteria
PQ, VK1	Cyanobacteria

UQ- Ubiquinone; MK-Menaquinone; PQ- Plastoquinone; VK1- Vitamin K

Kuinon merupakan senyawa yang terlarut dalam lipid yang secara luas terdistribusi di alam dan terdapat hampir di semua organisme. Kuinone diklasifikasikan ke dalam dua kelompok utama: ubiquinon (1-methyl-2-isoprenyl-3,4-dimethoxybenzoquinone) and menakuinon (1-isoprenyl-2-methyl-naphtho-quinone). Ubiquinon (UQ, ko-enzim Q) and menakuinon (MK, vitamin K₂) terjadi lebih sering pada membran plasma bakteri yang bertanggung jawab dalam transfer elektron. UQ dan MK memiliki rantai poliprenil dimana berbeda dalam jumlah unit isopren dan derajat ketidakjenuhan.

Gambar 1 mengilustrasikan struktur kimia dari UQ dan MK, dan lokasi kuinon dalam sel membran yang digunakan sebagai target dalam studi ini [3]. Kuinon dibentuk pada membran plasma yang berada di dalam sebuah kolam (*electron pool*). Secara sistematis, kuinon mempromosikan transfer elektron antara protein globular dan membran terluar.



Gambar 1. Struktur kimia dari UQ dan MK, dan lokasi kuinon dalam sel membran.

Teknik ekstraksi yang paling banyak digunakan untuk mengekstraksi mikroba adalah teknik *Bligh-Dyer* yang menggunakan campuran mengandung metanol, kloroform, dan penyangga fosfat [1,16]. Teknik ini telah diterapkan secara efektif untuk mengekstrak mikroba kuinon dari sedimen, air, dan tanah. Namun, teknik ini memerlukan waktu analisa yang lama, melibatkan penggunaan pelarut organik berbahaya dalam volume yang besar dan sangat mahal.

Oleh karena itu, pengkajian untuk mendapatkan pelarut alternatif baik dengan mengidentifikasi pelarut yang tidak merusak atau dengan mengembangkan teknologi alternatif yang membutuhkan volume pelarut yang lebih sedikit [6]. Selain itu, adanya kesadaran akan pembatasan penggunaan pelarut hidrokarbon karena kesehatan, keamanan, biaya dan faktor lingkungan, telah mengarahkan perhatian dalam konsep kimia hijau.

Salah satu kunci dalam pengembangan kimia

hijau adalah penggunaan fluida superkritis sebagai pelarut hijau. Sebagai sebuah teknologi hijau, ekstraksi fluida superkritis (EFS) memiliki potensi untuk menyelesaikan masalah yang berhubungan ekstraksi pelarut organik, khususnya kecepatan dan penggunaan volume pelarut yang rendah [13]. Aplikasi EFS untuk mengekstrak mikroba lipid dapat memberikan efisiensi ekstraksi yang lebih tinggi [6,5,4]. Karbon dioksida lebih umum digunakan sebagai fluida EFS karena memiliki nilai temperatur dan tekanan kritis yang relatif lebih rendah yaitu 31.1 °C dan 7.4 MPa.

Keuntungan menggunakan EFS adalah kemudahan dalam pemisahan produk ekstraksi dari pelarutnya. Selain itu, fluida superkritis memiliki densitas layaknya cairan tetapi dengan karakteristik transfer massa yang lebih besar dibandingkan pelarut cair karena memiliki difusi tinggi dan tensi permukaan yang sangat rendah yang dapat dengan mudah berpenetrasi ke dalam pori-pori struktur matrik dari padatan untuk melepaskan produk ekstraksi [13]. EFS telah digunakan untuk mengekstrak kuinon dari bakteri murni dan campuran. Namun, belum diketahui kehandalan penerapan teknik ini untuk sampel lingkungan karena ekstrak yang dihasilkan dari sampel lingkungan biasanya membutuhkan langkah pemurnian tambahan. Dalam studi ini, cartridge fase padat dipasang *in-line* pada instrumen EFS untuk menjebak mikroba kuinon dalam prosedur satu langkah tanpa pemurnian lebih lanjut.

EFS memiliki keuntungan dibandingkan ekstraksi pelarut konvensional karena parameter kondisi ekstraksi dapat dioptimalkan. Optimasi parameter ekstraksi memainkan peran penting dalam pengembangan metode EFS. Metode tradisional *trial-and-error* hanya dapat mengoptimalkan satu variabel EFS pada suatu waktu dan proses yang membutuhkan waktu yang lama [11]. Selain itu, interaksi antara dua variabel dapat menyebabkan hasil yang bias. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, metode EFS dioptimalkan menggunakan desain eksperimental secara statistik untuk mengeksplorasi hubungan antara beberapa variabel dengan satu atau lebih variabel respon.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengaplikasikan teknik EFS sebagai salah satu teknologi hijau untuk kuantifikasi mikroba kuinon dalam sampel lingkungan. Hasil kuantifikasi tersebut dapat digunakan sebagai indikator pemantauan kualitas lingkungan berbasis struktur komunitas mikroba. Pengaruh temperatur, tekanan, dan konsentrasi metanol terhadap *yield* dan jumlah total ekstrak kuinon dievaluasi menggunakan desain statistik percobaan. Struktur komunitas mikroba kuinone dalam beberapa

sampel lingkungan juga didiskusikan dengan membandingkan metode EFS dan metode konvensional.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Larutan standar dan perangkat

Standar ubikuinon (UQ-10) dan standar menakuinon (MK-7) diperoleh dari Nacalai Tesque, Jepang. Larutan standar 1.000 mg/L disiapkan dalam aseton dan ditempatkan pada temperatur 4 °C. Aseton, metanol, di-isopropil eter, heksan dalam tingkat HPLC. Tipe perangkat (*cartridge*) perangkat fase padat yang digunakan dalam studi ini adalah Sep-Pak® Plus C₁₈ silica cartridges (polypropylene tubes; berat sorben: 360 mg; ukuran partikel: 55–105 µm; ukuran pori: 125 Å).

2.2. Persiapan sampel

Sampel lumpur yang digunakan dalam studi ini diperoleh dari instalasi pengolahan air limbah (IPAL) domestik. Sampel lumpur digesi anaerob diperoleh dari proses digesi skala laboratorium campuran kotoran dan limbah makanan. Standar sampel untuk tanah, sedimen dan air kolam diperoleh dari standar sampel di laboratorium. Sebelum percobaan EFS, semua sampel dikeringkan dalam pengering *vacuum-freeze* selama 24 jam dan ditempatkan pada temperatur -20 °C sebelum dianalisis. Untuk mendapatkan distribusi ukuran partikel untuk ekstraksi, sampel tersebut digerus dan disaring dalam ukuran partikel lebih kecil dari 500 µm. Sampel kering sebanyak 100 mg digunakan untuk ekstraksi secara konvensional menggunakan pelarut organik dan EFS.

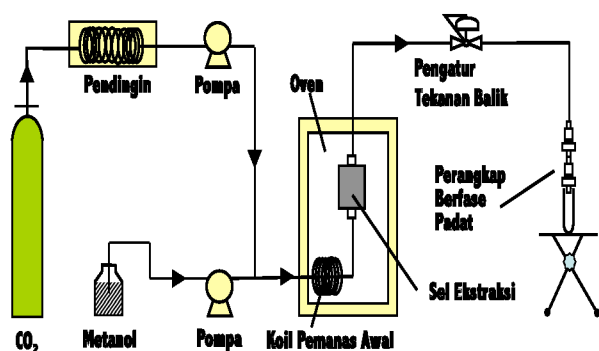
2.3. Ekstraksi konvensional pelarut organik

Metode konvensional dikarakterisasi dengan sistem ekstraksi satu fase menggunakan metanol dan kloroform dilanjutkan dengan pencucian dan fraksinasi fase padat. Ekstraksi dua kali dengan heksan dilakukan untuk mengambil kuinone dari hasil ekstraksi. Dua buah kolom Sep-Pak cartridge digabungkan secara seri digunakan dalam studi ini untuk menggantikan penggunaan kolom kromatografi lapisan tipis (*thin layer chromatography*) dimana secara simultan memurnikan dan memisahkan kuinon dari heksan berdasarkan perbedaan polaritas. Lima mL n-heksan di alirkan melalui cartridge Sep-Pak. Kemudian, ekstrak n-heksan yang mengandung kuinon diinjeksi ke dalam cartridge pada kecepatan aliran 24 mL/min. Fraksi yang terelusi dari Sep-Pak dievaporasi hingga kering, dan kemudian residu tersebut di larutkan kembali dalam aseton untuk selanjutnya dianalisis dengan kromatografi cairan (UPLC-*ultra performance*

liquid chromatography).

2.4. Ekstraksi fluida superkritik

Semua percobaan dilakukan menggunakan sistem EFS yang diilustrasikan dalam Gambar 2. Sampel kering sebanyak 100 mg ditempatkan dalam reaktor ekstraksi bervolume 1 mL, berbahan material SUS 316, panjang 47mm, dan diameter dalam 10mm. Metanol digunakan sebagai *modifier* dialirkan melalui pompa HPLC. Katup enam-cabang digunakan untuk *by-pass* ke reaktor ekstraksi yang ditempatkan dalam sebuah oven. Koil pemanas awal dengan panjang 2 m digunakan untuk membuat keseragaman campuran aliran CO₂ dan metanol dalam sistem selama proses ekstraksi.



Gambar 2. Skema diagram dari peralatan ekstraksi fluida superkritik yang digunakan.

Tekanan dalam sistem dimonitor menggunakan pengatur tekanan balik. Pengatur tekanan balik dipanaskan sampai 55 °C untuk mencegah pembentukan es kering. Kartridge fase padat dipasang secara seri pada sistem *port* keluaran SFE untuk menangkap dan mengumpulkan mikroba kuinon. Seluruh operasi dilakukan dalam mode dinamik selama 15 menit. Mode dinamik berarti campuran dilewatkan pada sampel didalam reaktor ekstraksi. Selama ekstraksi, lipid yang dihasilkan dikumpulkan dalam tabung gelas gelap untuk mencegah fotodekomposisi dan kemudian dikeringkan dengan aliran gas nitrogen.

2.5. Kromatografi cairan ultra performansi

Pemisahan kuinone dilakukan menggunakan kromatografi cairan ultra performansi (UPLC-*ultra performance liquid chromatography*). Waters Acquity UPLC system (Milford, MA, USA) dilengkapi dengan sebuah *binary solvent delivery manager* dan sebuah *photo-diode array detector* (PDA-2996, Waters). Kolom yang digunakan adalah Waters Acquity UPLC™ BEH C18 column (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm). Fase *mobile* terdiri dari 100% metanol dipompakan pada kecepatan aliran 0.5 mL/min. Analisis dilakukan pada 35 ± 1 °C selama 35 menit. Temperatur *autosampler* diatur

pada 4.0 ± 1 °C dan diinjeksikan dengan volume 10 μL.

Kuinon spesies diidentifikasi sesuai dengan waktu retensi dan spektrum dari setiap *peak* diobservasi pada detektor. Panjang gelombang yang digunakan untuk mengkuantifikasi UQ dan MK adalah 275 nm and 270 nm, berturut-turut.

Nomenklatur kuinon ditetapkan sebagai berikut: UQ dan MK dengan *n* isoprene unit pada rantai sisi di persingkat dengan UQ-*n* and MK-*n* secara berturut-turut. Sebagai contoh, UQ-8 mengidentifikasi sebuah ubikuinon dengan 8 unit isopren dan MK-8(H₂) sebagai sebuah menakuinon dengan 8 unit isopren dimana salah satu ikatan ganda dijenuhkan dengan 2 atom hydrogen [2,8].

2.6. Desain Percobaan

Seleksi dari kombinasi peubah *input* optimum dapat diselesaikan dengan pengembangan model matematika. Dalam studi ini, desain percobaan terdiri dari metodologi respon permukaan (RSM-*response surface methodology*) dengan desain komposit terpusat (CCD-*central composite design*) dengan tiga peubah dan lima tingkat perlakuan. Percobaan awal diperoleh bahwa tekanan, temperatur dan konsentrasi metanol adalah faktor utama yang mempengaruhi jumlah total kuinon terekstraksi. Jadi, parameter-parameter tersebut dipilih sebagai peubah independen dan data keluaran (total kuinon terekstraksi) sebagai variabel dependen. Seleksi faktor percobaan dalam nilai kode dan nilai aktual untuk EFS ditunjukkan dalam Tabel 1.

Tabel 2. Faktor percobaan dalam nilai kode dan nilai aktual untuk EFS dari mikroba kuinon dari lumpur IPAL.

Faktor	Notasi	Unit	Tingkat				
			-1.68(-α)	-1	0	+1	+1.68(+α)
Tekanan	P	MPa	3,18	10	20	30	36,82
Temperatur	T	°C	46,36	60	80	100	113,64
Persentase Metanol	M	%, v/v	1,59	5	10	15	18,41

Batas atas dari sebuah faktor dikodekan sebagai +1.68 (+alpha) dan batas bawah sebagai -1.68 (-alpha). Nilai kode untuk intermediasi (tengah) adalah 0. Titik faktorial dikodekan sebagai ±1. Pada pengujian CCD, 14 titik faktorial dan 9 titik pusat dilakukan untuk mendapatkan kesesuaian model kuadratik. Kombinasi dari percobaan-percobaan ini disebut sebagai matrik desain percobaan. Sembilan replikasi pada pusat desain digunakan untuk memperkirakan galat murni (*pure error*) dari jumlah kudrat (*sum of square*). Percobaan dilakukan secara acak untuk memaksimalkan pengaruh perubahan respon yang tidak dapat

dijelaskan. Jadi, 23 percobaan dilakukan untuk memperkirakan pengaruh parameter EFS. Persamaan 1 merupakan persamaan polinomial orde kedua yang digunakan dalam studi.

Persamaan (1) menggunakan peubah sebagai berikut: Y adalah respon yang diprediksi; kadalah jumlah faktor peubah; β_0 adalah konstanta model; β_1 adalah koefisien linier; β_{ij} adalah koefisien kuadratik; β_{ijk} adalah koefisien interaksi; dan x_i and x_j adalah kode peubah independen. Piranti Lunak Design Expert® (v8 trial, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) digunakan untuk analisis regresi dan visualisasi data respon permukaan. Kesesuaian model regresi dicek dengan koefisien determinasi (R^2). Signifikansi statistik dari model ditentukan dengan aplikasi *Fischer's F-test*. Analisis variansi (ANOVA) dilakukan untuk mengevaluasi signifikansi perbedaan antara peubah independen. Ketepatan model ditentukan dengan mengevaluasi galat murni (*pure error*), deviasi ketepatan (*lack of fit*), koefisien determinasi (*p-value*) and nilai uji Fisher (*F-value*).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Kesesuaian model dan analisis statistik

Percobaan awal menunjukkan bahwa tekanan, temperatur dan konsentrasi metanol sebagai faktor utama yang mempengaruhi jumlah total mikroba kuinon dalam EFS. Desain matrik sentral komposit dan respon untuk EFS dari mikroba kuinon dari lumpur IPAL dilaporkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Desain matrik sentral komposit dan respon untuk EFS dari mikroba kuinon dari lumpur IPAL

Desain matrik				Hasil		
Sid	Run	Faktor	Respon	Yield ^a	Kuinon ^b	
		Tekanan (MPa)	Temperatur (°C)	Metanol ^c (% v/v)	(mg/g ekstrak)	
1	10	-1 (10)	-1 (60)	-1 (5)	2,98	0,21
2	7	+1 (30)	-1 (60)	-1 (5)	7,24	0,26
3	16	-1 (10)	+1 (100)	-1 (5)	3,05	0,17
4	23	+1 (30)	+1 (100)	-1 (5)	7,17	0,23
5	2	-1 (10)	-1 (60)	+1 (15)	6,21	0,78
6	12	+1 (30)	-1 (60)	+1 (15)	8,02	1,12
7	22	-1 (10)	+1 (100)	+1 (15)	6,32	0,74
8	19	+1 (30)	+1 (100)	+1 (15)	7,39	0,98
9	4	-1.68 (3.18)	0 (80)	0 (10)	1,63	0,06
10	18	+1.68 (36.82)	0 (80)	0 (10)	7,34	0,62
11	13	0 (20)	-1.68 (46.36)	0 (10)	7,07	0,80
12	8	0 (20)	+1.68 (113.64)	0 (10)	7,46	0,73
13	1	0 (20)	0 (80)	-1.68 (1.59)	4,36	0,17
14	9	0 (20)	0 (80)	+1.68 (18.41)	7,08	0,73
15	11	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,96	0,52
16	21	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,67	0,68
17	5	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,47	0,62
18	17	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,41	0,70
19	3	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,19	0,76
20	20	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,47	0,57
21	15	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,29	0,58
22	6	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,40	0,52
23	14	0 (20)	0 (80)	0 (10)	7,10	0,54

^aPersentase metanol yang ditambahkan sebagai *modifier*.

^b Total *yield* ekstraksi dihitung % [(g ekstrak/g lumpur × 100)].

^c Rerata untuk dua kali percobaan (n=2).

Nilai kisaran tekanan, temperatur dan

konsentrasi metanol di tetapkan dengan mempertimbangkan kerusakan sel bakteri dengan kenaikan temperatur dan perubahan struktur sel dengan kenaikan tekanan. Oleh karena itu, kisaran pengaruh parameter yang diinvestigasi dipilih pada tekanan (10-30 MPa), temperatur (60-100 °C) and konsentrasi metanol (5-15%, v/v). Peubah independen dan dependen dianalisa untuk mendapatkan persamaan regresi yang dapat memperkirakan konsentrasi dengan kisaran yang diberikan.

Tabel 4 menunjukkan koefisien regresi yang diperoleh dengan melakukan *fitting* dari data percobaan ke model respon orde kedua untuk jumlah total kuinon yang diekstrak dan persentase perolehan (*yield*) produk. Tingkat kesesuaian model (*goodness of the fit of models*) diverifikasi dengan koefisien determinasi (R^2). Dalam percobaan ini, nilai R^2 untuk respirasi kuinon adalah 0,88. Hal ini ditunjukkan pula bahwa data dari percobaan memiliki tingkat kesamaan (*in agreement*) dengan nilai prediksi untuk jumlah total respirasi kuinon yang diekstraksi. Nilai R^2 terkoreksi (*adjusted R^2*) adalah 0,80, menunjukkan bahwa total variasi dalam jumlah total respirasi kuinon dipengaruhi peubah independen. Selain itu, bagian dari total variasi yang tidak dapat dijelaskan oleh model adalah 0,12%.

Tabel 4. Model kuadratik respon permukaan untuk EFS mikroba kuinone dari Lumpur IPAL

Faktor	Koefisien ^a	Yield	Kuinon
Intersep	b_0	7,43	0,61
P- tekanan	b_1	1,53*	0,12**
T- temperatur	b_2	$9,95 \times 10^{-3}$ **	-0,03**
M- metanol	b_3	0,88**	0,27**
PT	b_{12}	-0,11**	-0,01**
PM	b_{13}	-0,69**	0,06
TM	b_{23}	-0,06	-0,01
P ²	b_{11}	-0,98	-0,08
T ²	b_{22}	$4,94 \times 10^{-3}$	0,06
M ²	b_{33}	-0,54*	-0,05*
	R^2	0,98	0,88
	<i>Adjusted R²</i>	0,97	0,80
	Standar deviasi	0,32	0,12

^aBerdasarkan persamaan (1).

*Signifikan pada $p \leq 0,05$.

**Signifikan pada $p \leq 0,01$.

Data analisis variansi (ANOVA) digunakan untuk mengevaluasi signifikansi dari perbedaan persamaan model yang berhubungan dengan parameter model. Rangkuman hasil ANOVA untuk mikroba kuinon dari lumpur IPAL ditunjukkan dalam Tabel 5.

Hasil ANOVA model regresi kuadratik dari data percobaan menunjukkan bahwa model memiliki nilai uji *Fisher's (F-test)* yang sangat signifikan 70,97 (nilai $p < 0.0001$) untuk model *yield*

dan 10,80 (nilai $p=0.0001$) untuk model kuinon. Ketidaksiharian atau deviasi ketepatan dari nilai- F untuk model yield adalah 2.48 dan untuk model kuinon adalah 3.64. Hal ini mengimplikasikan bahwa deviasi ketepatan model (*lack of fit*) relatif tidak signifikan terhadap galat murni (*pure error*). Visualisasi tiga dimensi (3-D) respon permukaan diplot untuk mengevaluasi interaksi antara dua faktor percobaan dengan faktor ketiga yang diperlakukan konstan pada titik pusat (Gambar 3a,3b dan 3c).

Tabel 5. Parameter analisis statistik yang diperoleh dari ANOVA untuk EFS mikroba kuinone dari lumpur IPAL

Sumber	Derajat kebebasan	Jumlah kuadrat	Rerata kuadrat	Nilai-F	Nilai-p
Yield					
Model	9	66,20	7,36	70,97	<0,0001
Sisa	13	1,35	0,10		
Deviasi ketepatan	5	0,82	0,16	2,48	0,1216
Galat murni	8	0,53	0,066		
Total terkoreksi	22	67,55			
Kuinon					
Model	9	1,45	0,16	10,80	0,0001
Sisa	13	0,119	0,015		
Deviasi ketepatan	5	0,13	0,027	3,64	0,0515
Galat murni	8	0,059	$7,40 \times 10^{-3}$		
Total terkoreksi	22	1,65			

3.2. Pengaruh tekanan, temperatur dan konsentrasi metanol terhadap jumlah kuinon yang terekstraksi.

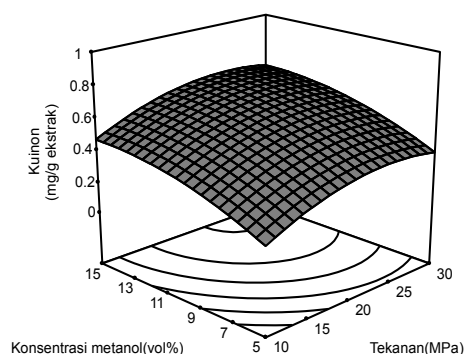
Gambar 3a, 3b dan 3c menunjukkan interaksi dan pengaruh tekanan, temperatur dan konsentrasi metanol terhadap total kuinon yang terekstraksi.

Total kuinon yang terekstraksi meningkat dengan peningkatan konsentrasi metanol. Namun, peningkatan temperatur menghasilkan penurunan total kuinon yang terekstraksi. Semua peubah independen secara signifikan mempengaruhi jumlah total kuinon yang terekstraksi, dengan parameter temperatur memberikan pengaruh negatif. Interaksi antara temperatur dan konsentrasi metanol memiliki pengaruh yang signifikan terhadap jumlah total kuinon yang terekstraksi (Nilai $p<0.01$, Tabel 4). Tekanan meningkatkan jumlah total kuinon yang terekstraksi hingga kira-kira 22 MPa untuk selanjutnya tidak terjadi peningkatan yang signifikan.

Ketika mempertimbangkan peubah secara individual, kondisi ekstraksi yang dapat memaksimalkan jumlah total kuinon yang terekstraksi diperoleh pada 22 MPa, 60 °C and a 15% (v/v) konsentrasi metanol. Hasil ini diperoleh melalui proses optimalisasi dengan simulasi piranti lunak *Design Expert*.

Peningkatan temperatur diketahui menurunkan densitas pelarut dan konsekuensinya menurunkan jumlah total kuinon yang terekstraksi pada tekanan

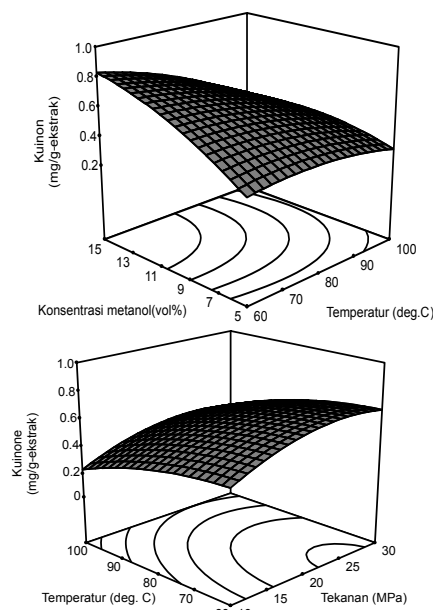
konstan. Pada waktu yang sama, temperatur yang lebih tinggi mempromosikan solubilitas larutan dan meningkatkan perolehan (*yield*) dengan peningkatan transfer massa dari matrik larutan dan atau dari matrik larutan ke pelarut[13]. Oleh karena itu, peningkatan temperatur dapat memberikan pengaruh positif atau negatif berdasarkan kesetimbangan antara densitas CO₂ dan tekanan uap larutan. Peningkatan tekanan menghasilkan peningkatan densitas CO₂ dengan peningkatan kemampuan pelarutan (*solvating power*) pada EFS. Peningkatan tekanan dari 10 to 20 MPa mengindikasikan peningkatan yang stabil terhadap jumlah total kuinone yang terekstraksi dalam studi ini.



(a)

(b)

(c)



Gambar 3. Interaksi dan pengaruh tekanan, temperatur dan konsentrasi metanol terhadap total kuinon yang terekstraksi.

3.3. Perbandingan EFS dan Konvensional ekstraksi pelarut organik.

Tabel 6 menunjukkan perbandingan kuantitatif EFS dan konvensional untuk mikroba kuinone dari lumpur IPAL. Delapan tipe kuinon telah

diidentifikasi dari sampel lumpur IPAL. Tipe kuinone tersebut diidentifikasi sebagai bakteri gram positif, *non-sulfur* bakteri, *cytophagales group*, dan lain-lain sesuai dengan katalog kuinone dari Collin, dkk (1980). Dengan dominasi bakteri anaerob membuktikan bahwa sampel lumpur IPAL diperoleh dari produk lumpur aktif keluaran dari proses anaerob. Hal ini menunjukkan bahwa metode EFS memiliki tingkat sensitifitas yang relatif tinggi untuk mikroba kuinon. Jumlah dan tipe mikroba kuinon yang sama diperoleh ketika menggunakan metode pelarut organik. Ini mengindikasikan bahwa metode EFS tidak mengubah informasi dari struktur komunitas mikroba. Konsentrasi dari individual kuinone hampir sama atau identik untuk kedua metode. Hasil ekstraksi kuinon dari metode EFS sesuai dengan metode konvensional. Namun, metode EFS terbukti lebih sederhana, cepat dan dengan konsumsi pelarut organik yang lebih rendah, seperti ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 6. Perbandingan kuantitatif mikroba kuinone dari lumpur IPAL dari metode EFS dan konvensional.

Biomarka	EFS		Konvensional	
	Konsentrasi (mg/g ekstrak)	SD ^b (mg/g ekstrak)	Konsentrasi (mg/g ekstrak)	SD (mg/g ekstrak)
<u>Kuinon^a</u>				
MK-6	0.052	0.005	0.038	0.006
MK-7	0.355	0.012	0.465	0.043
MK-8	0.073	0.009	0.072	0.010
MK-9	0.060	0.008	0.045	0.010
MK-10	0.029	0.008	0.022	0.019
MK-8(H ₂)	0.146	0.038	0.102	0.031
MK-9(H ₂)	0.090	0.038	0.084	0.025
MK-9(H ₄)	0.091	0.015	0.086	0.025

^aNomeklatur kuinon dijelaskan dalam Gambar 1.

^bStandar deviasi (SD) dari rerata tiga (n=3) percobaan.

3.4. Aplikasi metode EFS untuk identifikasi komunitas mikroba kuinon dari berbagai sampel lingkungan

Informasi dan data perubahan populasi dari mikroba kuinon dalam sebuah sistem lingkungan dapat digunakan untuk pemantauan kualitas lingkungan dalam sebuah ekosistem.

Metode EFS dilakukan pada kondisi optimum 22 MPa, 60 °C and a 15% (v/v) konsentrasi metanol. Diperoleh bahwa sampel air dari kolam rawa dan sedimen sungai menunjukkan tingkat ubikuinon (UQ) yang relatif tinggi, dibandingkan sampel lingkungan lain yang diujikan. Sedangkan sampel dari lumpur IPAL, tanah dan proses

digesi anaerob memiliki tingkat menakuinon (MK) yang relatif lebih tinggi. Hal ini juga membuktikan sensitifitas dari metode EFS untuk mengkarakterisasi mikroba kuinon dari berbagai sampel lingkungan. Beberapa literatur juga menunjukkan hasil identifikasi komunitas mikroba kuinon yang sama [4,15,12,9].

Tabel 7. Perbandingan jumlah pelarut, waktu dan peralatan pada metode EFS dan konvensional

Per sampel	Konvensional	EFS
Pelarut yg dibutuhkan	450 mL	4.5 mL
Waktu Ekstraksi	48 jam	15 min
Persiapan sampel	3 jam	1 jam
Total waktu analisis	3 hari	2 jam
Peralatan	Murah	Mahal
Purifikasi	Lama	Singkat
Prosedur/Metode	Umum digunakan	Relatif Baru

4. KESIMPULAN

Penelitian ini menyajikan beberapa temuan untuk aplikasi ekstraksi fluida superkritik sebagai salah satu teknologi hijau dalam pemantauan kualitas lingkungan dengan mengidentifikasi struktur komunitas mikroba kuinon. Metodologi respon permukaan diterapkan untuk mengoptimalkan kondisi EFS dengan memaksimalkan jumlah total mikroba kuinon yang diekstraksi. Delapan spesies mikroba kuinon telah berhasil diidentifikasi dari sampel lumpur IPAL. Selain itu, sensitivitas dari metode ini juga telah diujikan pada berbagai jenis sampel lingkungan seperti tanah, sedimen, air rawa, dan lain-lain. Determinasi secara simultan UQ dan MK dalam sampel menggunakan kromatografi cairan ultra performansi (UPLC) telah mengeliminasi prosedur persiapan sampel yang lama dan kompleks. Penelitian lebih lanjut sedang berlangsung dalam mengembangkan penerapan metode ini sebagai metode rutin untuk mengidentifikasi struktur komunitas mikroba kuinon dari berbagai jenis sampel. Kombinasi EFS dan UPLC merupakan metode yang efektif dalam mengkarakterisasi mikroba kuinon untuk pemantauan kualitas lingkungan. Data dan informasi yang diperoleh dari studi ini secara signifikan dapat digunakan untuk memperluas informasi profil mikroba kuinon di lingkungan. Pengembangan database struktur komunitas mikroba yang terintegrasi dengan data lingkungan merupakan salah satu alasan untuk perkembangan studi ini secara lebih detail di masa mendatang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bligh, E.G.; Dyer, W.J.A 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology* 37: 911-917.
2. Collins, M.D.; Jones, D. (1981). Distribution of

- isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiological Reviews* 45: 316-354.
3. Hanif M., (2012). Doctoral Dissertation, Toyohashi University of Technology, Japan, pp. 1-180.
 4. Hanif M., Atsuta Y., Fujie K., Daimon H. (2012). Supercritical Fluid Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography of Respiratory Quinones for Microbial Community Analysis in Environmental and Biological Samples, *Molecules*, 17: 2628-2642.
 5. Hanif M., Atsuta Y., Fujie K., Daimon H. 2012. Supercritical Fluid Extraction of Bacterial and Archaeal Lipid Biomarkers from Anaerobically Digested Sludge, *International Journal of Molecular Science*, 13: 3022-3037.
 6. Hanif M., Atsuta Y., Fujie K., Daimon H., (2010). Supercritical fluid extraction of microbial phospholipid fatty acids from activated sludge, *Journal of Chromatography A*, 1217: 6704-6708.
 7. Hedrick, D.B.; White, D.C. (1986). Microbial respiratory quinones in the environment: a sensitive liquid chromatographic method. *Journal of Microbiology Methods* 5: 243-254.
 8. Hiraishi, A. (1999) Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88: 449-460.
 9. Irvan; Atsuta, Y.; Saeki, T.; Daimon, H.; Fujie, K. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of ubiquinones and menaquinones from activated sludge. *Journal of Chromatography A* 2006: 1113, 14-19.
 10. Katayama, A.; Funasaka, K.; Fujie, K. (2001). Changes in the respiratory quinone profile of a soil treated with pesticides. *Biology and Fertility of Soils* 33: 454-459.
 11. Montgomery, D. C. Design and analysis of experiment, 6th ed.; John Wiley & Sons Inc.: New York, USA, 2005; pp. 427-439.
 12. Narihiro, T.; Sekiguchi, Y. 2007. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 273-278.
 13. Pourmortazavi, S.M.; Hajimirsadeghi, S.S. (2007) Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* 1163, 2-24.
 14. Rittmann, B.E. (2006). Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. *Trends in biotechnology* 24: 261-266.
 15. Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Harada, H. Recent advances in methane fermentation technology. *Current Opinion Biotechnology* 12: 277-282.
 16. White, D.C.; Davis, W.M.; Nickels, J.S.; J.D. King, Bobbie, R.J. (1979). Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40: 51-62.