

**LAPORAN AKHIR PROJEK PENYELIDIKAN USM JANGKA
PENDEK**

**Pemencilan dan pencirian granul Poli(3-hidroksialkanoat) yang dihasilkan oleh
Pseudomonas USM 4-55**

Dr. K. Sudesh Kumar (Penyelidik Utama)
Prof. Madya Dr. Mohd. Razip Samian (Penyelidik Bersama)
Prof. Dr. Mohd. Isa Abd Majid (Penyelidik Bersama)

Pelajar yang telah terlibat di dalam sebahagian daripada projek penyelidikan ini

Cik Chee Jiun Yee (Calon PhD)
Cik Tan Chu Lee (Pelajar Tahun Akhir, BSc. 2003)
En. Cheah Yew Hong (Pelajar Tahun Akhir, BSc. 2003)

1.0 Pengenalan

Polihidroksialkanoat (PHA) merupakan sejenis poliester yang dihasilkan oleh pelbagai bakteria sebagai bahan simpanan karbon dan tenaga. Jenis PHA yang paling banyak dikaji ialah poli(3-hidroksibutirat) [P(3HB)]. Sehingga kini hampir 150 jenis unit juzuk monomer telah dijumpai. Ini menunjukkan PHA boleh terdiri daripada banyak jenis kombinasi monomer.

Sifat PHA yang menjadi daya tarikan utama ialah ciri termoplastik yang boleh diuraikan secara semulajadi oleh mikroorganisma di persekitaran. PHA juga sesuai untuk menghasilkan pelbagai produk dalam bidang industri, perubatan, farmasi dan pertanian. Plastik sintetik yang kini digunakan secara meluas diperbuat daripada petroleum. Pengurangan dalam bekalan petroleum yang semakin merunsingkan juga merupakan satu masalah yang perlu kita hadapi. Dalam hal ini, PHA merupakan calon yang berpotensi kerana PHA boleh dihasilkan daripada sumber karbon yang boleh diperbaharui seperti gula dan minyak tumbuhan.

2.0 Objektif Penyelidikan

Bakteria *Pseudomonas* sp. USM4-55 yang digunakan dalam penyelidikan ini telah dipencilkan daripada tanah di sekitar Tasik Chini, Pahang oleh Anthoni Agustien. Pencirian polimer daripada bakteria ini telah dilakukan dengan menggunakan ^1H dan ^{13}C NMR ('nuclear magnetic resonance') serta kromatografi gas spektrometri jisim (GC-MS). Berdasarkan pencirian, polimer yang dihasilkan oleh bakteria *Pseudomonas* sp. USM4-55 terdiri daripada campuran heteropolimer P(3HB) dan poli(3-hidroksialkanoat) [P(3HA)] dengan juzuk-juzuk monomer 3-hidroksiheksanoat (C_6), 3-hidroksioktanoat (C_8), 3-hidroksidekanoat (C_{10}), 3-hidroksidodekanoat (C_{12}), 3-hidroksi-cis-5-dodekanoat ($\text{C}_{12:1}$) dan 3-hidroksitetradekanoat (C_{14}) apabila asid oleik digunakan sebagai sumber karbon.

Plastik yang dihasilkan oleh bakteria *Pseudomonas* sp. USM4-55 ini dikategorikan sebagai plastik yang lembut dan menunjukkan ciri-ciri elastomer hampir serupa kepada getah. Ia berbeza daripada plastik yang dihasilkan daripada polimer P(3HB) dan poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) [(P3HB-ko-3HV)] yang mirip kepada ciri-ciri yang hadir pada polipropilina. Objektif utama projek ini ialah untuk menganalisis granul-granul yang dihasilkan oleh *Pseudomonas* sp. USM4-55 untuk menentukan sama ada campuran heteropolimer P(3HB) dan P(3HA) terkandung dalam granul yang sama ataupun berbeza.

Langkah-langkah berikut telah dijalankan untuk mencapai objektif kajian ini:

1. Teknik mikroskopik digunakan untuk mengesan proses pengumpulan polimer.
2. Penggunaan kromatografi gas untuk menentukan kandungan dan komposisi polimer yang dihasilkan.

Granul PHA akan dipencilkan berdasarkan ketumpatan dengan menggunakan alat pengempur ultra.

3.0 Keputusan dan Perbincangan

3.1 Keluk Pertumbuhan *Pseudomonas* sp. USM4-55

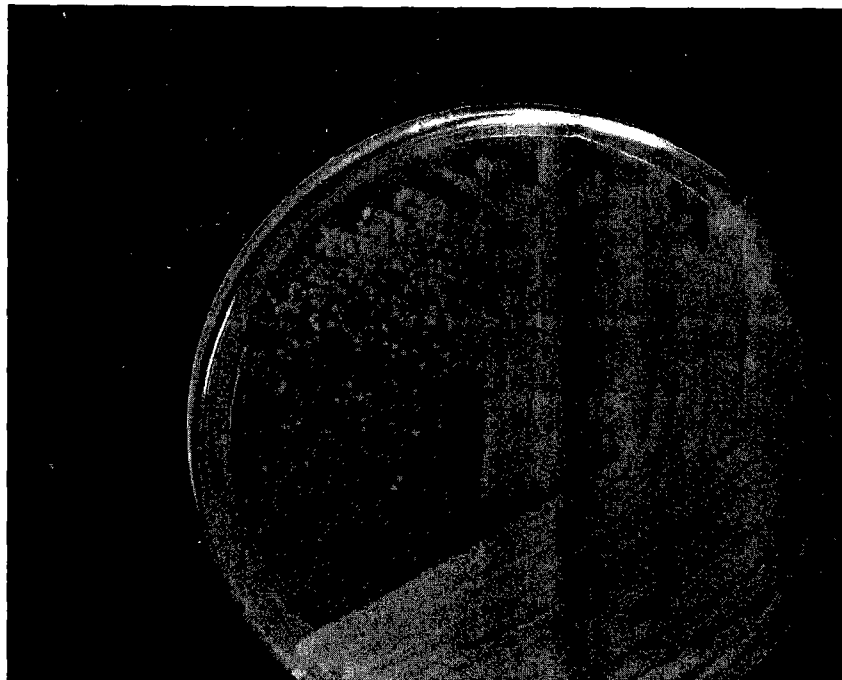
Keluk pertumbuhan *Pseudomonas* sp. USM4-55 telah diplotkan seperti yang ditunjukkan pada Rajah 1.

3.2 Pemerhatian Granul PHA Intraselular Secara Mikroskopik

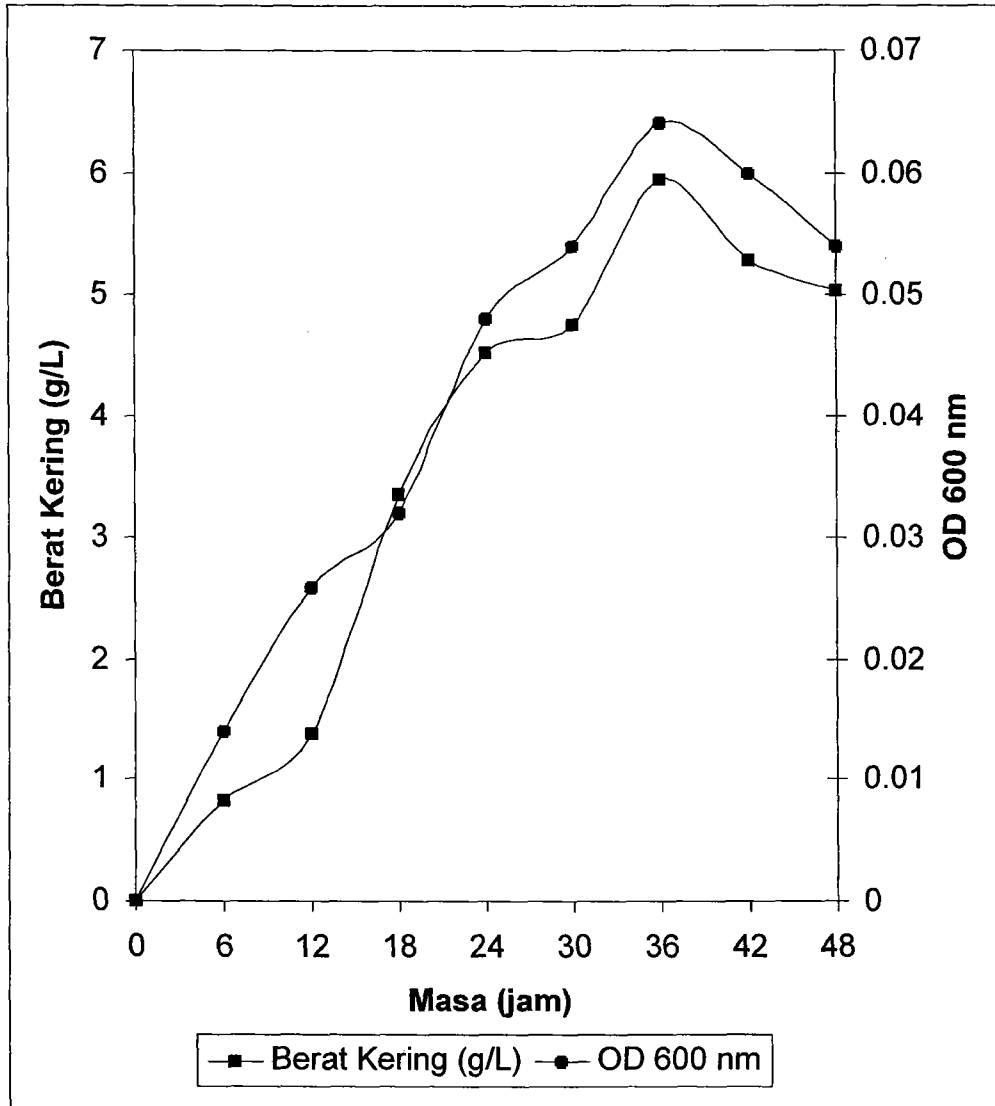
Slaid yang telah disediakan akan diperhatikan di bawah mikroskop UV. Pemerhatian slaid *Pseudomonas* sp. USM4-55 menunjukkan sel yang berpendarfluor dengan warna kuning-kejinggaan seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 2. Keputusan pemerhatian ini hanya menunjukkan kehadiran granul PHA secara umum.

3.3 Analisis Kromatografi Gas (GC) Sel Kering

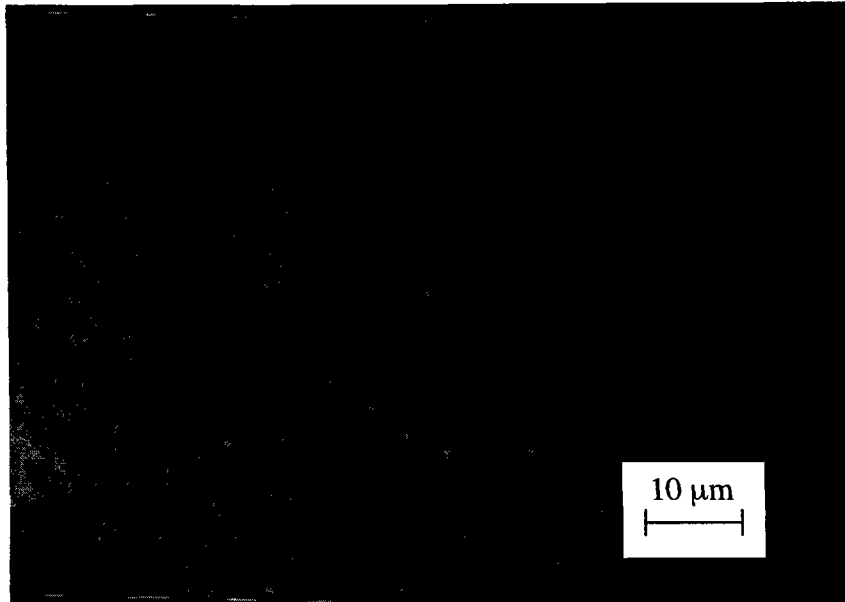
Sel Kering yang telah mengalami proses metanolisis, dianalisis dengan alat kromatografi gas. Keputusan analisis sel kering menunjukkan puncak-puncak masa pada sekitar minit ke 5.333, 7.342, 10.3, 14.167, 17.283, 19.958, 19.692 dan 22.058 yang menunjukkan monomer-monomer 3HB, CAME, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C_{12:1} dan C₁₄.



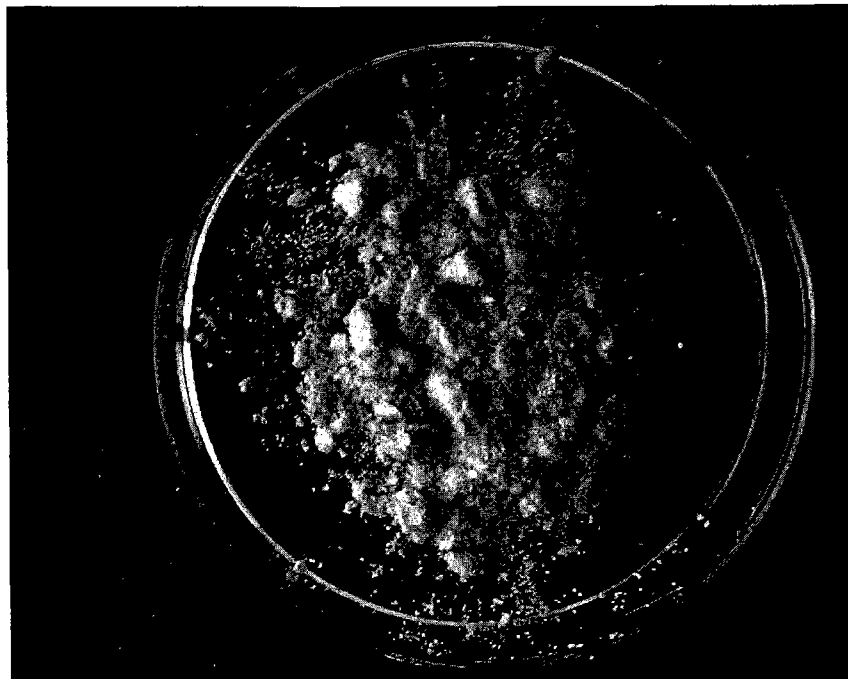
Gambar foto 1: Pertumbuhan *Pseudomonas* sp. USM4-55 pada NA



Rajah 1: Keluk Pertumbuhan *Pseudomonas* sp. USM4-55 yang dijalankan selama 48 jam.



Gambar foto 2: Sel *Pseudomonas* sp. USM4-55 yang telah diwarnakan dengan Nile Blue A dan diperhatikan di bawah mikroskop UV dengan magnifikasi 1000X.



Gambar foto 3: Sel *Pseudomonas* sp. USM4-55 yang telah dikeringkan dengan alat pengering sejuk-beku.

3.4 Pengekstrakan Dan Penulenan P(3HA) Yang Dihasilkan Oleh USM4-55

Gambar foto 3 menunjukkan sel USM4-55 yang telah dikeringkan. Sel-sel kering ini seterusnya digunakan untuk pengekstrakan polimer. Polimer yang dimendak keluar daripada kloroform dengan metanol sejuk merupakan satu campuran polimer. Campuran polimer dapat dipisahkan kepada dua jenis, iaitu P(3HB) dan PHA_{MCL} dengan menggunakan propanol panas. Polimer P(3HB) berwarna putih dan bersifat rapuh seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 4. Polimer PHA_{MCL} pula berwarna kekuningan, bersifat lutsinar, melekit seperti getah dan merupakan sejenis elastomer seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 5.

3.5 Analisis Kromatografi Gas Polimer Ekstrakan Sel Kering

Polimer yang telah dipisahkan dengan menggunakan propanol panas dilakukan proses metanolisis dan dianalisis dengan alat kromatografi gas. Kromatogram kromatografi gas hasil daripada analisis GC ke atas P(3HB) yang diekstrak keluar daripada USM4-55 menunjukkan terdapat 2 puncak yang utama yang mewakili metil ester 3HB dan mewakili metil ester asid kaproik yang bertindak sebagai piawai dalaman. Kromatogram kromatografi gas hasil daripada analisis GC ke atas PHA_{MCL} yang diekstrak keluar daripada USM4-55 didapati selain daripada puncak piawai dalaman, terdapat 6 puncak yang mewakili PHA_{MCL}, iaitu bagi metil ester asid 3-hidroksiheksanoik (C₆), metil ester asid 3-hidroksioktanoik (C₈), metil ester asid 3-hidroksidekanoik (C₁₀), metil ester asid 3-hidroksi-5-cis-dodekanoik (C_{12:1}), metil ester asid 3-hidroksidodekanoik (C₁₂) dan metil ester asid 3-hidroksitetradekanoik (C₁₄).

3.6 Pengiraan Peratusan PHA

Sampel ekstrakan telah dihantar ke Institut RIKEN, Jepun untuk analisis kromatografi gas. Formula pengiraan yang digunakan ialah:

$$\% \text{ PHA (mg)} = K \times \frac{(\text{Luas di bawah puncak PHA}_{\text{MCL}} \times \text{Faktor PHA}_{\text{MCL}})}{\text{Berat kering sel (mg)} \times \text{Luas di bawah puncak piawai dalaman}} \times 100 \%$$

Di mana K = Pemalar GC
= 7.59

Contoh Pengiraan:

$$\% \text{ PHA (mg)} = 7.59 \times \frac{\{C_4 + (0.51 \times C_6) + [(C_8 \sim C_{14}) \times 0.28]\}}{\text{Berat kering sel (mg)} \times \text{Luas di bawah puncak piawai dalaman}} \times 100 \%$$

% PHA yang dikira adalah sebanyak 98 %.

$$\% \text{ Monomer} = \frac{\text{Luas di bawah puncak monomer tertentu}}{\text{Luas di bawah puncak jumlah monomer}} \times 100 \%$$

Contoh Pengiraan:

$$\% \text{ Monomer } C_6 = \frac{(0.51 \times C_6)}{\{C_4 + (0.51 \times C_6) + [(C_8 \sim C_{14}) \times 0.28]\}} \times 100 \%$$

% Monomer yang dikira adalah seperti dalam Jadual 1.

Jadual 1: Peratusan monomer-monomer PHA_{MCL} apabila 0.5 % (i/i) asid oleik digunakan.

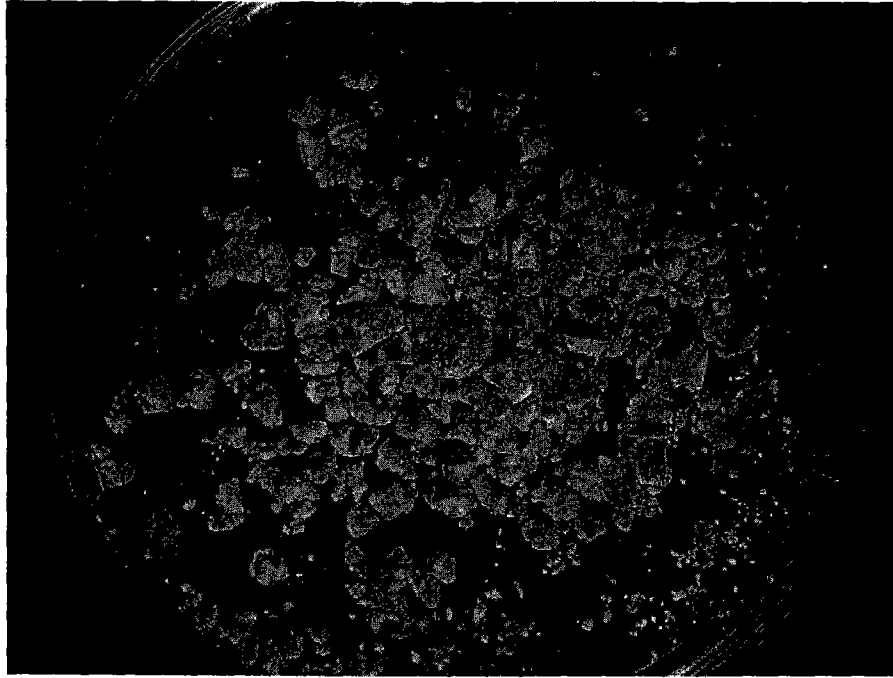
Jenis Monomer	% Monomer Dalam PHA Yang Diekstrak (%)
C ₄	35
C ₆	3
C ₈	19
C ₁₀	23
C ₁₂	10
C _{12:1}	2
C ₁₄	8

3.6 Analisis Kromatografi Gas 2 M Sukrosa

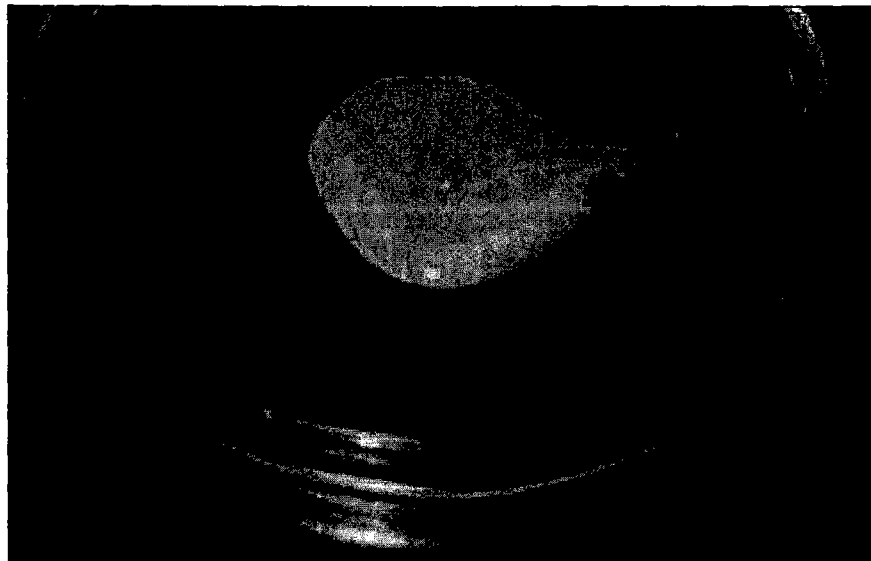
2 M sukrosa telah disejukkan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan dikeringkan telah menjalankan proses metanolisis dan dianalisis dengan alat kromatografi gas. Selain puncak piawai dalaman terdapat satu puncak signifikan yang menunjukkan puncak bagi sukrosa.

3.7 Pemerhatian Pemecahan Sel Basah Secara Mikroskopik

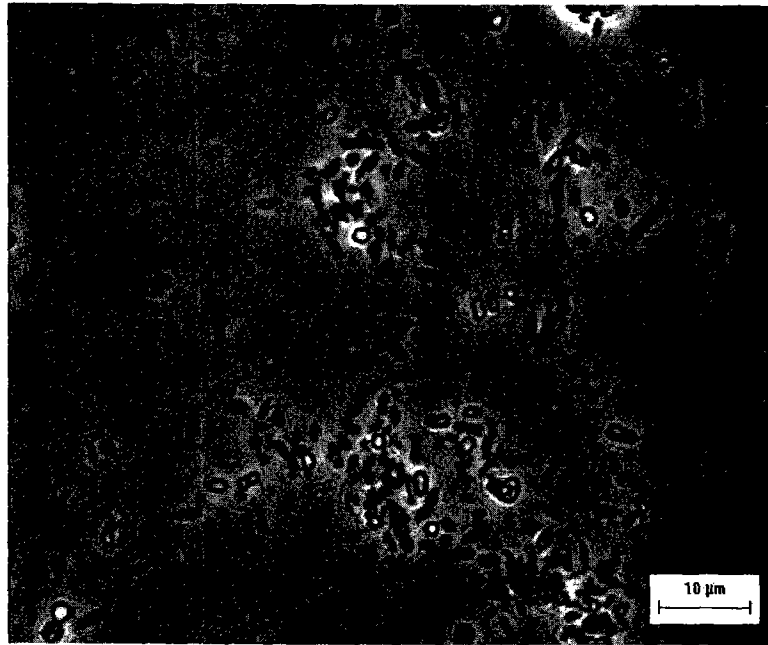
Slaid yang telah disediakan akan diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa. Pemerhatian slaid *Pseudomonas* sp. USM4-55 sebelum proses sonifikasi seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 6 dan selepas proses sonifikasi seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 7 menunjukkan sel-sel telah dipecahkan dengan menggunakan kuasa bunyi.



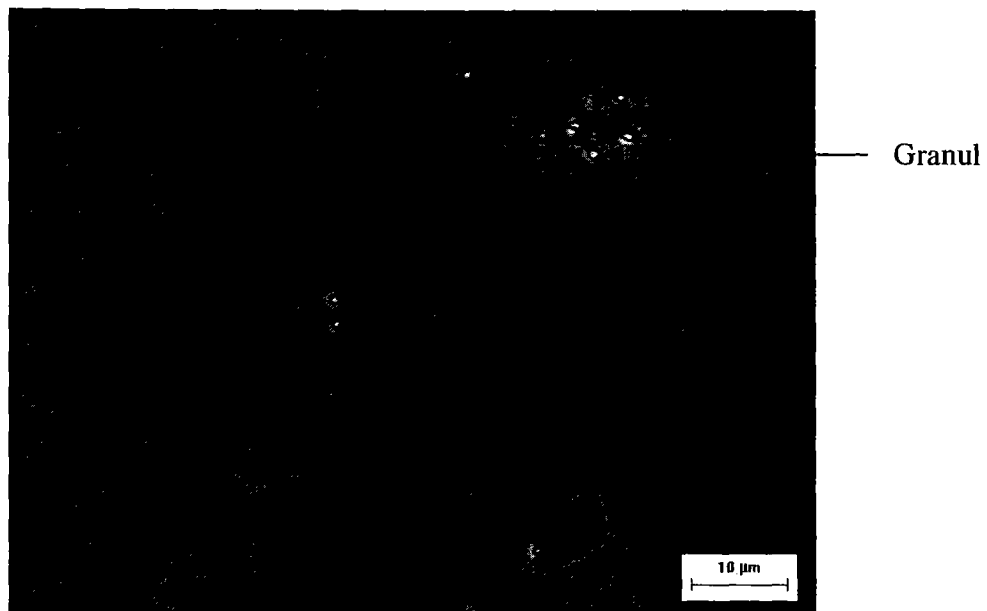
Gambar foto 4: Polimer tulen P(3HB) yang diekstrak keluar daripada *Pseudomonas* sp. USM4-55.



Gambar foto 5: Polimer tulen MCL yang diekstrak keluar daripada *Pseudomonas* sp. USM4-55.



Gambar foto 5: Sel *Pseudomonas* sp. USM4-55 sebelum menjalankan proses sonifikasi dan diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa dengan magnifikasi 1000X.



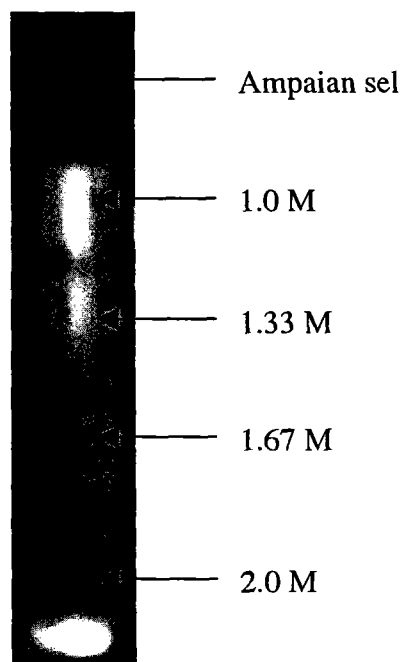
Gambar foto 6: Sel *Pseudomonas* sp. USM4-55 selepas menjalankan proses sonifikasi selama 25 minit dengan frekuensi 60 dan diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa dengan magnifikasi 1000X.

3.8 Analisis Pengemparan Kecerunan Ketumpatan

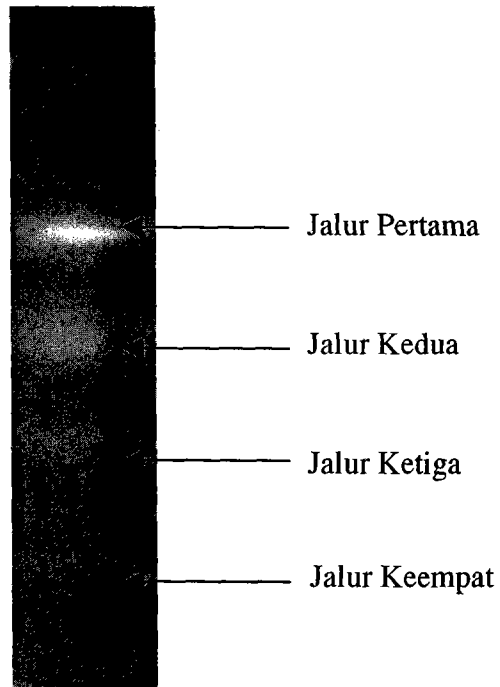
Gambar foto 7 menunjukkan tiub yang mengandungi kecerunan sukrosa tak berterusan dan ampaian sel sebelum diemparkan dengan menggunakan alat pengempar ultra. Empat jalur dapat diperhatikan selepas tiub-tiub yang mengandungi kecerunan sukrosa tak berterusan dan ampaian sel diemparkan dengan menggunakan alat pengempar ultra seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 8.

3.9 Pemerhatian Hasil Empat Jalur Secara Mikroskopik

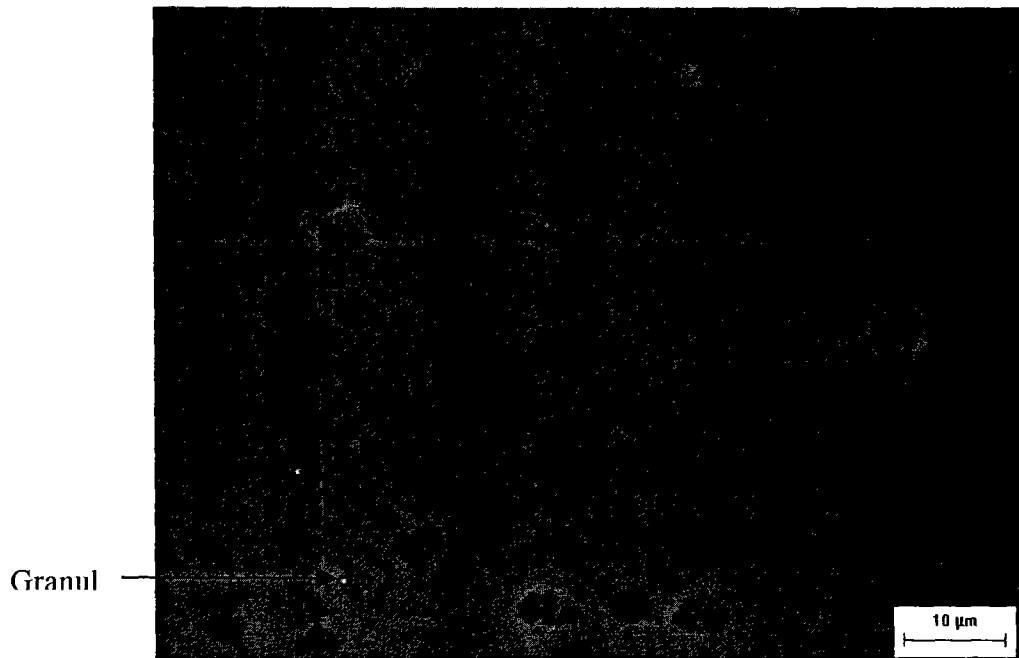
Slaid yang telah disediakan akan diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa. Pemerhatian slaid hasil jalur pertama adalah seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 9, pemerhatian slaid hasil jalur kedua adalah seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 10, pemerhatian slaid hasil jalur ketiga adalah seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 11 dan akhirnya pemerhatian slaid hasil jalur keempat adalah seperti yang ditunjukkan pada gambar foto 12.



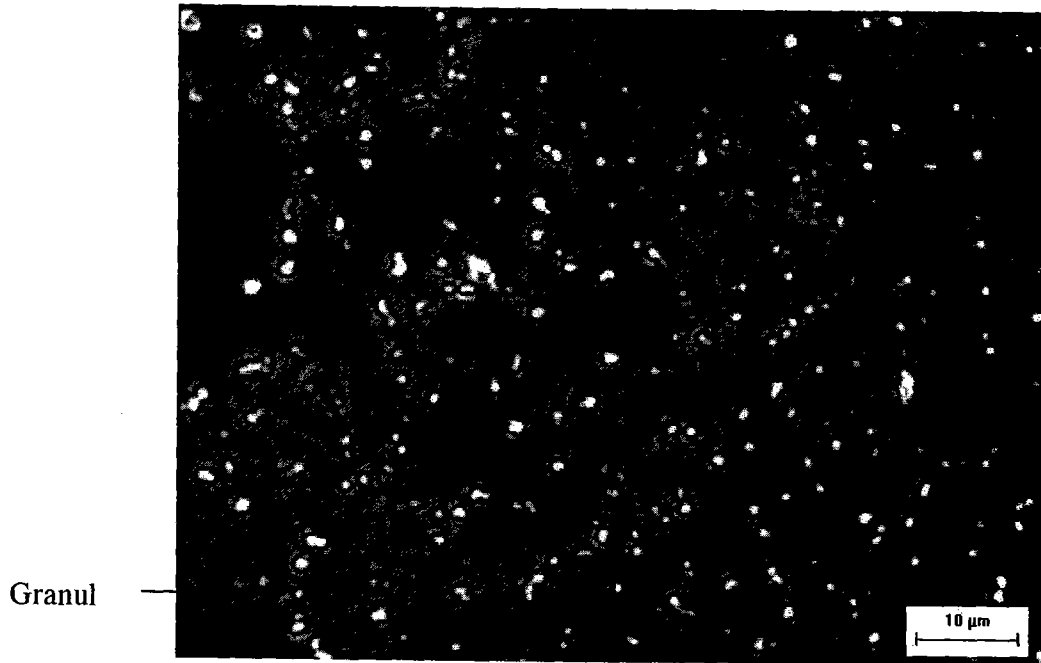
Gambar foto 7: Tiub yang mengandungi kecerunan sukrosa tak berterusan dan ampaian sel sebelum diemparkan dengan menggunakan alat pengempar ultra.



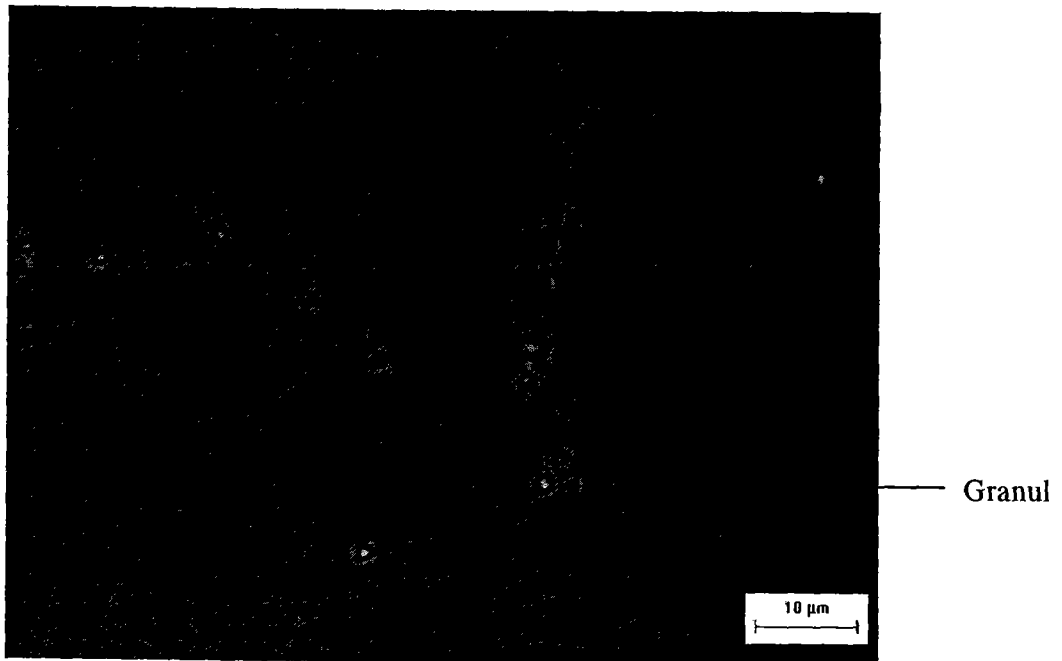
Gambar foto 8: Empat jalur yang terhasil selepas proses pengemparan dengan menggunakan alat pengempar ultra.



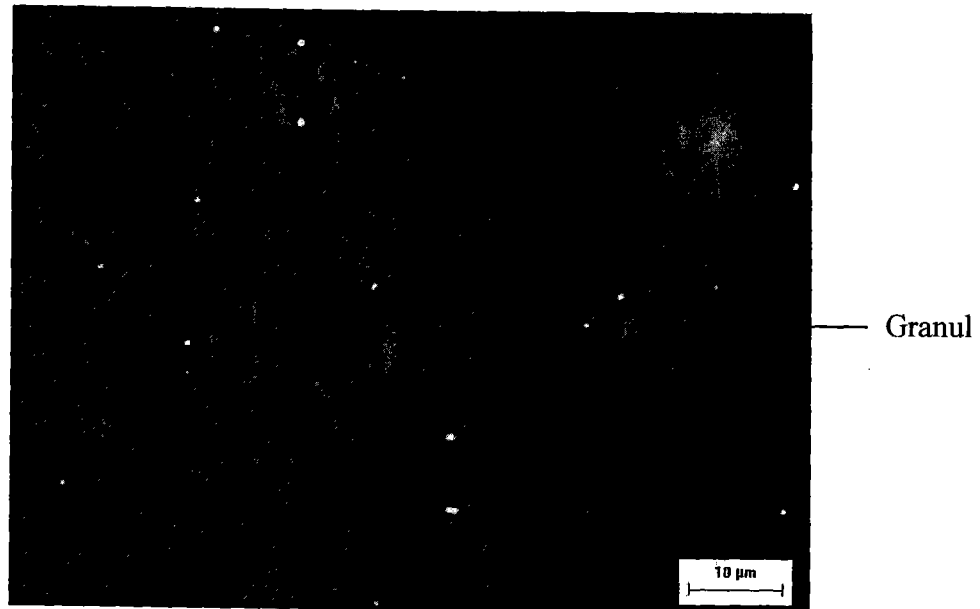
Gambar foto 9: Hasil jalur pertama yang diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa dengan magnifikasi 1000X.



Gambar foto 10: Hasil jalur kedua yang diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa dengan magnifikasi 1000X.



Gambar foto 11: Hasil jalur ketiga yang diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa dengan magnifikasi 1000X.



Gambar foto 12: Hasil jalur keempat yang diperhatikan di bawah mikroskop beza fasa dengan magnifikasi 1000X.

3.10 Analisis Kromatografi Gas Pengemparan Kecerunan Ketumpatan

Hasil sejukbeku empat jalur dijalankan metanolisis, dianalisiskan dengan menggunakan alat kromatografi gas. Keputusan (Jadual 2) menunjukkan jalur pertama menunjukkan puncak-puncak pada masa minit tertentu bagi monomer 3HB, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂ dan C₁₄. Kromatogram menunjukkan jalur kedua mempunyai monomer 3HB, C₈ dan C₁₀. Jalur ketiga menunjukkan hanya terdapat puncak monomer 3HB. Jalur keempat menunjukkan terdapat puncak monomer 3HB yang amat sedikit sehingga boleh diabaikan.

Jadual 2: Monomer-monomer yang terdapat pada hasil jalur-jalur pengemparan kecerunan ketumpatan.

Jalur	3HB	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C _{12:1}	C ₁₄
Pertama	√	√	√	√	√	—	√
Kedua	√	—	√	√	—	—	—
Ketiga	√	—	—	—	—	—	—
Keempat	—	—	—	—	—	—	—

4.0 Kesimpulan

Keputusan di atas telah menunjukkan bahawa *Pseudomonas* sp. USM4-55 merupakan sejenis mikroorganisma yang berupaya menghasilkan dua jenis biopolimer, iaitu P(3HB) dan PHA_{MCL} pada masa yang sama dalam satu sel. Hal ini merupakan ciri yang sangat istimewa kerana sehingga kini tidak banyak penghasil PHA semulajadi yang dilaporkan berupaya menghasilkan PHA_{SCL} dan PHA_{MCL} serentak pada sel yang sama. Kebanyakan penghasil PHA menghasilkan PHA_{SCL} (C₃~C₅) atau PHA_{MCL} (C₆~C₁₄) sahaja.