

# Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012



## INTERAKSI BIOSURFAKTAN DAN ENZIM LIPASE BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DALAM SOLUBILISASI *OIL SLUDGE*

### Tim Peneliti

Dr. Ni'matuzahroh  
Dr. Sri Sumarsih, M.Si.  
Fatimah, S.Si., M.Kes.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan  
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan  
Perguruan Tinggi Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2012  
Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2012



# Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012



## INTERAKSI BIOSURFAKTAN DAN ENZIM LIPASE BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DALAM SOLUBILISASI *OIL SLUDGE*

### Tim Peneliti

Dr. Ni'matuzahroh  
Dr. Sri Sumarsih, M.Si.  
Fatimah, S.Si., M.Kes.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan  
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan  
Perguruan Tinggi Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2012  
Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2012



**HALAMAN PENGESAHAN**

1. JUDUL : INTERAKSI BIOSURFAKTAN DAN ENZIM LIPASE  
BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DALAM  
SOLUBILISASI *OIL SLUDGE*

2. Ketua Peneliti  
 a. Nama Lengkap : Dr. Ni'matuzahroh  
 b. Jenis Kelamin : Perempuan  
 c. NIP : 19680105 199203 2003  
 d. Pangkat/Golongan : Pembina / IVA  
 e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 f. Bidang Keahlian : Mikrobiologi  
 g. Fakultas / Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi  
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

## 3. Tim Peneliti

No.	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Fakultas	Perguruan Tinggi
1.	Dr. Sri Sumarsih, M.Si.	Biokimia	F. Sains dan Teknologi, Unair	Universitas Airlangga
2.	Fatimah S.Si., M.Kes.	Mikrobiologi	F. Sains dan Teknologi, Unair	Universitas Airlangga

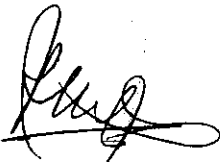
## 4. Pendanaan dan Jangka waktu Penelitian

a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun  
 b. Biaya yang diusulkan : Rp. 30.000.000,-  
 c. Biaya yang disetujui tahun 2012 : Rp. 30.000.000,-

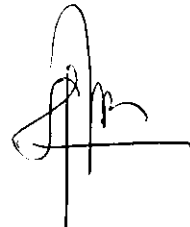
Surabaya, 30 Oktober 2012

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Unair

Ketua Peneliti,



Prof. Win Darmanto, M.Si, PhD.  
NIP. 19610616 198701 1 001



Dr. Ni'matuzahroh  
NIP. 19680105 199203 2 003

Menyetujui,

Ketua Lembaga Penelitian



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.  
NIP. 19590805 198701 1 001



# INTERAKSI BIOSURFAKTAN DAN ENZIM LIPASE BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DALAM SOLUBILISASI OIL SLUDGE

(Ni'matuzahroh, Sri Sumarsih, Fatimah)

## ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui jenis interaksi produk biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dan *Bacillus subtilis* 3KP dan dengan tiga enzim lipase bakteri indigenus hidrokarbonoklastik dari spesies *Micrococcus* sp. LII61, *Bacillus* sp. LII63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7 dalam solubilisasi hidrokarbon dalam *oil sludge*. Biosurfaktan kedua jenis bakteri diproduksi menggunakan media air mineral sintetik dengan molase sebagai substrat dan ditumbuhkan pada kondisi optimum hasil penelitian sebelumnya. Enzim lipase dideteksi secara kualitatif menggunakan media padat selektif mengandung garam mineral, minyak dan Rhodamin-B. Enzim lipase diproduksi dengan menumbuhkan dua bakteri potensial penghasil lipase terpilih pada media selektif hidrokarbon cair. Biosurfaktan dan enzim lipase diekstraksi menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat. Uji solubilisasi *oil sludge* dilakukan dengan variasi jenis dan konsentrasi biosurfaktan serta variasi jenis dan konsentrasi enzim lipase. Hasil solubilisasi *oil sludge* dideteksi dengan metode gravimetri. Data yang diperoleh berupa karakteristik biosurfaktan uji, nilai aktivitas enzim lipase dari isolat bakteri hidrokarbonoklastik dianalisis secara deskriptif. Sedangkan, persentase solubilisasi *oil sludge* dianalisis secara statistik menggunakan Anova dan dilanjutkan dengan uji Duncan dengan derajat signifikansi 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis biosurfaktam, jenis enzim, konsentrasi biosurfaktan, dan konsentrasi enzim, serta interaksi biosurfaktan dan enzim memberikan pengaruh dalam meningkatkan dan menghambat kelarutan *oil sludge*. Kombinasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 (=CMC) dan enzim *Micrococcus* sp. LII61 (37,5% v/v) merupakan kombinasi terbaik dalam kelarutan *oil sludge*. Interaksi jenis biosurfaktan-enzim yang tepat dalam meningkatkan solubilisasi *oil sludge* diharapkan dapat diaplikasikan untuk penanganan *oil sludge* di industri minyak.

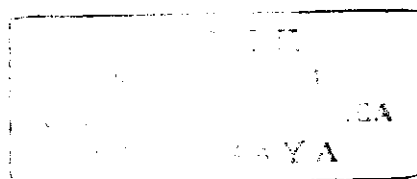
*Kata kunci* : biosurfaktan, enzim, bakteri hidrokarbonoklastik, solubilisasi, *oil sludge*





## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	i
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN.....	ii
DAFTAR ISI .....	iii
PRAKATA .....	v
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	
I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1 Definisi <i>oil sludge</i> .....	4
2.2. Komponen kimia <i>oil sludge</i> .....	5
2.3. Tinjauan tentang Biosurfaktan.....	6
2.4. Tinjauan tentang Enzim Lipase.....	10
2.5. Aktivitas lipolitik mikroba hidrokarbonoklastik.....	12
2.6 Tinjauan tentang Uji Solubilisasi <i>Oil Sludge</i> .....	12
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	14
3.1 TUJUAN PENELITIAN.....	14
3.2 MANFAAT PENELITIAN.....	14
IV. METODE PENELITIAN .....	15
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
4.2 Bahan dan Alat.....	15
4.3 Cara Kerja.....	16
4.4 Analisis Data.....	24
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	16
5.1 Hasil Penelitian.....	25
5.2 Pembahasan.....	30
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	33
DAFTAR PUSTAKA .....	34
LAMPIRAN .....	





## PRAKATA

Segala puji bagi Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia, melalui dana DIPA Universitas Airlangga /APBN Rupiah Murni yang telah menerima proposal penelitian Unggulan Perguruan Tinggi kami di tahun 2012 dan memberikan bantuan finansial sehingga penelitian ini dapat terselenggara dengan baik.

Dalam kesempatan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- 1) Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si. yang telah memberikan kemudahan selama pelaksanaan penelitian ini
- 2) Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan semangat dan penyediaan fasilitas ruangan dan alat untuk terselenggaranya penelitian ini.
- 3) Ketua Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Dr. Alfiah Hayati, yang telah memberikan semangat, dan penyediaan fasilitas ruangan dan alat untuk terselenggaranya penelitian ini.
- 4) Staf pengajar Departemen Biologi F. Sains dan Teknologi Universitas Airlangga atas segala saran, masukan, dukungan semangat, bantuannya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.
- 5) Mahasiswa/wi S2 dan S1 di laboratorium mikrobiologi Nur Hidayatul Alami, Nurul Fitria Qur'aini, Hidayatul Muna, Erna, Intan Ayu Pratiwi, dan Isnaeni, dan Nur Bani Fatmalia atas segala bantuan waktu, tenaga, pikiran, dan semangatnya untuk bergabung dalam penelitian ini.
- 6) Karyawan di Departemen Biologi dan Departemen Kimia atas segala bantuan fisik dan dukungannya yang sangat menunjang kelancaran pelaksanaan penelitian ini.
- 7) Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang turut memberi bantuan baik waktu, tenaga, dan pikiran dalam pelaksanaan penelitian ini.

Semoga Allah membalas semua kebaikan amalan Bapak, Ibu dan adik-adik sekalian. Semoga hasil penelitian ini bisa bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di Indonesia dan dapat diaplikasikan nantinya bagi kepentingan masyarakat.

Surabaya , 30 Oktober 2012

**Tim Peneliti:**

Dr. Ni'matuzahroh, Ketua Peneliti  
Dr. Sri Sumarsih, M.Si., Anggota Peneliti  
Fatimah, S.Si., M.Kes., Anggota Peneliti  
Suwarni, Teknisi



**DAFTAR TABEL**

<b>No.</b>	<b>Judul Tabel</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1	Daftar tipe fraksi hidrokarbon pada berbagai tempat penyulingan minyak bumi	5
Tabel 2.2	Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba	7
Tabel 4.1	Kombinasi perlakuan penelitian	22
Tabel 5.1.	Produksi biosurfaktan dan uji karakteristik biosurfaktan dua bakteri ( <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) dan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP)	25
Tabel 5.2.	Perolehan produk dan nilai CMC biosurfaktan dari bakteri <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) dan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP	25
Tabel 5.3.	Nilai aktivitas enzim lipolitik tiga jenis bakteri pada 16 jam inkubasi	27



## DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Struktur enzim lipase dari <i>Bacillus subtilis</i>	11
Gambar 2.2	Reaksi hidrolisis minyak oleh lipase	12
Gambar 5.1.	Hasil uji aktivitas enzim lipase supernatan kultur <i>Micrococcus sp.</i> L II 61	26
Gambar 5.2.	Grafik aktivitas enzim lipase <i>Bacillus sp.</i> LII63B	26
Gambar 5.3.	Pertumbuhan dan aktivitas lipolitik bakteri <i>Actinobacillus sp.</i> pada media Busnell Haas + minyak goreng 1%	26
Gambar 5.4.	Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan <i>Acinetobacter sp.</i> P2(1) dan enzim lipase <i>Micrococcus sp</i> LII 61	27
Gambar 5.5.	Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan <i>Acinetobacter sp.</i> P2(1) dan enzim lipase <i>Bacillus sp.</i> LII 63B	27
Gambar 5.6.	Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan <i>Acinetobacter sp.</i> P2(1) dan enzim lipase <i>Actinobacillus sp.</i> P3-7	28
Gambar 5.7.	Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP dan enzim lipase <i>Micrococcus sp</i> LII 61	28
Gambar 5.8.	Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP dan enzim lipase <i>Bacillus sp.</i> LII 63B	29
Gambar 5.9.	Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP dan enzim lipase <i>Actinobacillus sp.</i> P3-7	29
Gambar 5.10 .	Interaksi biosurfaktan <i>Acinetobacter sp.</i> P(2)-1 dengan enzim <i>Micrococcus sp.</i> LII61 (a); <i>Bacillus sp.</i> , LII 63B (b) dan <i>Actinobacillus sp.</i> , P3-7	31
Gambar 5.11.	Interaksi biosurfaktan <i>Bacillus sp.</i> 3KP dengan enzim <i>Micrococcus sp</i> LII61 (a); <i>Bacillus sp.</i> , LII 63B (b) dan <i>Actinobacillus sp.</i> , P3-7	31





## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

Limbah padat lumpur minyak bumi (*oil sludge*) merupakan limbah akhir dari serangkaian proses dalam industri pengilangan minyak bumi. Minyak hasil dari penyulingan minyak mentah biasanya disimpan dalam suatu tangki- tangki penyimpanan. Akibat adanya kontak antara minyak, udara, dan air, dihasilkan suatu sedimentasi dari partikel- partikel halus bahan bakar minyak pada dasar tangki penyimpanan. Sedimen atau endapan itulah yang disebut *oil sludge* (Sugiarto, 2004).

Endapan *oil sludge* tersebut bersifat kental, liat dan sangat menempel. Endapan tersebut semakin lama semakin menumpuk pada bagian bawah dari tangki - tangki penyimpanan atau pada pipa- pipa penyaluran bahan bakar minyak. Akumulasi *oil sludge* pada dasar tangki penyimpanan minyak dapat menyebabkan berkurangnya kapasitas operasional, berkurangnya waktu kerja dan mempercepat proses korosi pada tangki. Hal ini tentunya akan menimbulkan kerugian bagi industri pengilangan minyak bumi, sehingga perlu adanya upaya pembersihan atau pengangkatan *oil sludge* dari dasar tangki- tangki penyimpanan minyak tersebut (Banat dan Rancich, 2009).

Salah satu agen atau bahan yang dapat digunakan untuk membersihkan atau mengangkat *oil sludge* dari dasar tangki penyimpanan adalah surfaktan. Surfaktan (*surface active agent*) adalah molekul amfifatik yang terdiri atas gugus hidrofilik dan hidrofobik, sehingga dapat berada diantara cairan yang memiliki sifat polar dan ikatan hidrogen yang berbeda, seperti minyak dan air. Hal ini menyebabkan surfaktan mampu mereduksi tegangan permukaan dan membentuk mikroemulsi sehingga hidrokarbon dapat larut di dalam air dan sebaliknya (Desai dan Banat, 1997).

Jenis surfaktan yang selama ini umum digunakan untuk keperluan pembersihan tangki penyimpanan minyak dari *oily sludge* adalah surfaktan kimia (sintetis). Namun, pemakaian beberapa surfaktan kimia dapat menyebabkan masalah bagi lingkungan, karena sifatnya yang resisten untuk dapat dipecah secara biologi dan sangat toksik saat terakumulasi dalam suatu ekosistem alam (Fiechter, 1992).

Upaya untuk mendapatkan surfaktan yang *biodegradable* dan ramah lingkungan dilakukan dengan memanfaatkan mikroorganisme. Surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme ini disebut biosurfaktan. Sifat khas yang diinginkan pada aplikasi



biosurfaktan untuk pembersihan minyak meliputi peningkatan kelarutan, penurunan tegangan permukaan dan *Critical Micelle Concentration* (CMC) yang rendah.

Upaya eksplorasi bakteri penghasil biosurfaktan yang dilakukan oleh tim peneliti dari laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi F. Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, telah berhasil mendapatkan isolat – isolat bakteri potensial penghasil biosurfaktan antara lain *Bacillus subtilis* 3KP (Ni'matuzahroh *et al.*, 2003) dan *Acinetobacter* sp. P2(1) (Ni'matuzahroh, *et al.*, 2009) pada media pertumbuhan dengan penambahan molase. Hasil uji karakterisasi produk kasar biosurfaktan kedua bakteri tersebut menunjukkan adanya perbedaan jenis biosurfaktan. Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP tergolong kelompok *bioemulsifier* dimana aktivitas emulsifikasinya dapat mencapai 66,72% terhadap minyak uji solar (Ni'matuzahroh *et al.* 2010). Selain itu, biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* 3KP pada substrat molase juga mampu menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur hingga 31,1 dyne/cm (Ulum, 2004). Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP termasuk dalam kelompok lipopeptida (Yuliani, 2004), sedangkan jenis biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) masih dalam penelitian di laboratorium.

Uji awal potensi solubilisasi hidrokarbon pada lumpur industri minyak (*oil sludge*) dari kedua produk biosurfaktan tersebut sedang dilakukan pada tahun 2011 ini. Efisiensi dan efektivitas biosurfaktan dalam solubilisasi hidrokarbon *oil sludge* tengah diupayakan ditingkatkan melalui berbagai inovasi. Beberapa penelitian penambahan enzim pada surfaktan sintetik terbukti memberikan hasil yang bervariasi, ada yang meningkatkan dan ada yang menurunkan aktivitas detergensinya (Jurado, *et al.*, 2007). Takeyama *et al.* (2002) juga menunjukkan bahwa penggabungan supernatan dari kultur cair *Bacillus subtilis* IAM1213 penghasil biosurfaktan dengan supernatan dari kultur cair *Aeromonas* sp. NKB26c penghasil enzim (seperti lipase dan protease) sebagai *biocleaner*, menghasilkan efisiensi *cleaning* yang lebih tinggi dalam membersihkan *crude oil* dari ubin keramik bangunan pabrik jika dibanding dengan penggunaan supernatan dari *Bacillus subtilis* IAM1213 saja. Molekul hidrofilik dan hidrofobik dari biosurfaktan akan menyebabkan minyak larut dalam air. Enzim lipase akan mendegradasi minyak yang tidak larut dalam air menjadi produk yang larut dalam air.

Penelitian ini akan mengungkap interaksi antara biosurfaktan bakteri *Bacillus subtilis* 3KP dan *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan enzim lipase bakteri hidrokarbonoklastik, isolat lokal dari lumpur minyak Pertamina Balongan, dalam solubilisasi *oil sludge*. Hasil penelitian diharapkan dapat dijadikan sebagai acuan dalam upaya pembersihan dan



pengangkatan *oil sludge* dari dasar tangki- tangki penyimpanan minyak yang berbasis ramah lingkungan.

## 1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah interaksi antara jenis biosurfaktan dan jenis enzim lipase dalam solubilisasi hidrokarbon pada *oil sludge* ?
2. Bagaimanakah interaksi antara konsentrasi biosurfaktan dan konsentrasi enzim lipase dalam solubilisasi hidrokarbon pada *oil sludge* ?
3. Bagaimanakah interaksi kombinasi jenis dan konsentrasi biosurfaktan terhadap jenis dan konsentrasi enzim lipase dalam solubilisasi hidrokarbon pada *oil sludge* ?
4. Kombinasi manakah yang dapat menghasilkan solubilisasi *oil sludge* tertinggi?



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Definisi *oil sludge*

*Oil sludge* merupakan salah satu bentuk limbah dari proses pengilangan minyak. *Oil sludge* dikenal dengan sebutan lumpur minyak bumi yang merupakan kotoran minyak yang terbentuk dari proses pengumpulan dan pengendapan kontaminan minyak (Setyowati, 2003). Sedangkan menurut Shofinita (2009), *oil sludge* adalah endapan sedimentasi partikel – partikel halus dari bahan bakar minyak pada dasar tangki penyimpanan, akibat adanya proses oksidasi yang dipicu oleh kontak antara minyak, udara, dan air. Endapan tersebut berupa lumpur atau pasta yang berwarna hitam, kadang – kadang tercampur dengan tanah, kerikil, air, dan bahan lainnya. Endapan tersebut semakin lama semakin menumpuk pada bagian bawah dari tangki – tangki penyimpanan atau pada pipa – pipa penyaluran bahan bakar minyak, sehingga dapat menyumbat pipa, mengurangi kapasitas-kapasitas operasional dan kapasitas kerja dari tangki penyimpanan minyak serta mempercepat proses korosi (Banat dan Rancich, 2009).

Menurut Lasari (2010), produksi kilang minyak bumi sebanyak 1000 barrel per hari akan menghasilkan *oil sludge* lebih dari 2,6 barrel. Sedangkan produksi kilang minyak bumi di Indonesia yaitu sekitar 1,2 juta barrel per hari yang menghasilkan *oil sludge* sebanyak 3.120 barrel per hari, dan dalam waktu satu tahun dihasilkan *oil sludge* sebanyak 1,3 juta barrel.

Limbah industri minyak (*oil sludge*) menjadi perhatian yang luar biasa karena dapat mengandung 20% BTEX (*benzene, toluene, ethylbenzene, xylene*) dan hal tersebut berada pada taraf yang berbahaya. Meskipun tidak dapat larut dengan air, campuran BTEX mudah dipindahkan dan dapat mencemari tanah (Bossert dan Compeau, 1995 dalam Patin, 1999).

Di Indonesia, *oil sludge* pada umumnya ditimbun dalam kolam-kolam dan menumpuk bertahun-tahun. Sejak kegiatan kilang minyak beroperasi sampai sekarang belum ada kegiatan pengolahan. Upaya pengolahan *oil sludge* dengan menggunakan metode yang efisien dan ramah lingkungan dapat mengurangi dampak negatif yang ditimbulkan oleh limbah industri minyak (*oil sludge*) bagi lingkungan. Metode pelarutan dengan menggunakan biosurfaktan diharapkan dapat mempermudah membersihkan *sludge* yang tersisa dalam tangki – tangki penyimpanan atau pada pipa – pipa penyaluran, sehingga mengurangi terbentuknya kerak.





## 2.2. Komponen kimia *oil sludge*

*Oil sludge* berupa kerak minyak mentah, terdiri dari minyak (hidrokarbon), air, abu, karat tangki, pasir, dan bahan kimia lainnya (Sugiarto, 2004). Kandungan dari hidrokarbon pada *oil sludge* antara lain adalah bensin, toluena, etilbenzena, xilen, dan logam berat seperti timbal (Pb). Selain itu, *oil sludge* juga mengandung abu, karat tangki, pasir dan bahan kimia lainnya. Dan jika ditinjau dari komposisinya, *oil sludge* dapat berupa hidrokarbon yang dibentuk dari rangkaian karbon mulai dari 1 atau 2 unit karbon ( $C_1$ ,  $C_2$ , natural gas) sampai dengan molekul dengan rantai karbon yang panjang ( $C_{15}$ - $C_{30+}$ ) (Pertamina, 2001 dalam Budihardjo, 2007).

Sedangkan menurut Priestly (1991) dalam Asia *et al.* (2006), *oil sludge* tidak hanya mengandung bahan anorganik, tetapi juga bakteri, virus, minyak dan lemak, nutrisi seperti nitrogen dan fosfor, logam berat dan senyawa organoklorin. Akan tetapi, menurut Pertamina (2001) dalam Budihardjo (2007), kandungan terbesar dalam *oil sludge* adalah *petroleum hydrocarbon*

Sifat dasar *oil sludge* tergantung pada pada sumber limbah tersebut berasal, yaitu tempat penyulingan minyak. Daftar tipe fraksi hidrokarbon dari berbagai tempat penyulingan minyak di beberapa Negara disajikan pada tabel 2.1.

**Tabel 2.1** Daftar tipe fraksi hidrokarbon pada berbagai tempat penyulingan minyak bumi (Ward *et al.*, 2003 dalam Vincent, tanpa tahun).

Location of refinery	Sludge TPH (%)	Hydrocarbon fractions (% of total)			
		Saturates	Aromatics	Resins	Asphaltenes
Ontario (A)	18.8	49.6	32.7	10.3	7.4
Ontario (B)	15.8	42.0	42.0	6.9	9.1
Ontario (C)	13.2	40.4	40.4	7.1	7.6
Quebec	9.3	48.7	25.6	10.2	15.5
Western Canada	20.2	21.2	47.8	9.6	21.4
Eastern Canada	20.9	46.4	33.5	10.8	9.3
Western USA	17.1	45.4	37.8	3.9	12.9
Eastern USA	15.5	44.3	43.7	6.7	5.4
Latin America (A)	15.1	51.3	18.9	14.9	14.9
Latin America (B)	21.3	41.2	35.6	9.7	13.5
South East Asia	33.7	44.7	40.8	6.5	8.0
Middle East	8.3	38.3	45.5	6.9	9.3

Adapun karakteristik dari limbah lumpur minyak bumi asal Balongan meliputi TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) 66%, kandungan minyak (*oil content*) 32,56%, Asphalten 0,86%, Cd 0,14 ppm, Cr 2,96 ppm, Cu 3,58 ppm, Ni 58,21 ppm, Pb 7,90 ppm dan Zn 73,53 ppm (PPSDAL, 2000 dalam Rossiana, 2007).



## 2.3. Tinjauan tentang Biosurfaktan

### 2.3.1. Definisi biosurfaktan

Biosurfaktan merupakan senyawa aktif permukaan yang dihasilkan dan disekresikan oleh mikroorganisme ke dalam media pertumbuhannya (Tabatabaee *et al.*, 2005). Senyawa aktif permukaan tersebut mempunyai struktur amfifatik, yang tersusun atas gugus hidrofobik dan hidrofilik. Gugus hidrofobik dapat berupa asam lemak jenuh dan tak jenuh seperti asam lemak rantai panjang, hidroksi asam lemak, atau  $\alpha$ -alkil- $\beta$ -hidroksi asam lemak dan gugus hidrofilik dapat berupa anion, kation peptida, asam amino, siklopeptida, fosfat, asam karboksilat, alkohol, mono-, di-, atau polisakarida karbohidrat dan lain-lain (Vater *et al.*, 2002). Karena adanya struktur amfifatik tersebut, biosurfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan dan *Critical Micelle Dilution* (CMD). Serta mengakibatkan mikroemulsi yang memungkinkan terbentuknya emulsi minyak dalam air (*oil in water*) atau air dalam minyak (*water in oil*) (Tabatabaee *et al.*, 2005). Meskipun sebagian besar biosurfaktan dianggap sebagai metabolit sekunder, namun terdapat beberapa biosurfaktan yang berperan penting untuk kelangsungan hidup mikroorganisme penghasilnya dengan cara meningkatkan transport nutrisi lintas membran sel mikroba, berperan dalam interaksi antara host dengan mikroba, atau berperan sebagai agen biosida (Rodrigues *et al.*, 2006). Biosurfaktan mempunyai keuntungan bila dibandingkan dengan surfaktan sintetik yang lain, diantaranya toksisitasnya rendah, *biodegradable*, ramah lingkungan, berbisa, dan dapat aktif bekerja pada suhu, pH dan salinitas yang ekstrim (Tabatabaee *et al.*, 2005).

Berdasarkan kemampuan tersebut, biosurfaktan berpotensi untuk digunakan dalam industri makanan, farmasi, kosmetik dan industri minyak (Desai dan Banat, 1997; Bordoloi dan Konwar, 2008). Kemampuan biosurfaktan dalam aplikasinya dipengaruhi oleh karakteristik biosurfaktan dan jenis mikroba penghasil biosurfaktan.

### 2.3.2 Karakteristik biosurfaktan dan jenis mikroba penghasil biosurfaktan

Secara umum, biosurfaktan dapat dibedakan menjadi biosurfaktan dengan berat molekul besar dan berat molekul kecil.

#### a. Biosurfaktan dengan berat molekul besar

Sejumlah spesies bakteri dengan jenis yang berbeda menghasilkan polimer surfaktan ekstraseluler yang terdiri atas polisakarida, protein, lipopolisakarida, lipoprotein, atau campuran kompleks dari biopolimer-biopolimer ini. Umumnya biosurfaktan dengan



berat molekul besar mempunyai kemampuan yang lebih tinggi dalam mengemulsi hidrokarbon minyak (*bioemulsifier*).

b. Biosurfaktan dengan berat molekul kecil

Biosurfaktan dengan berat molekul yang kecil dapat menurunkan tegangan permukaan atau antar permukaan dan polimer-polimer yang terikat secara erat pada permukaan. Biosurfaktan dengan berat molekul kecil secara umum terdiri atas glikolipida atau lipopeptida. Beberapa biosurfaktan jenis tersebut yang telah diteliti adalah glikolipida, rhamnolipida, trehalolipida, dan sophorolipida. Beberapa jenis biosurfaktan ini merupakan disakarida dengan gugus asetil asam lemak rantai panjang atau asam lemak terhidroksi. Beberapa antibiotika lipopeptida menunjukkan sifat aktif permukaan yang potensial (Ron dan Rosenberg, 2001). Beberapa jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba disajikan pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba

Jenis	Biosurfaktan	Mikroba Penghasil
Berat molekul besar	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	<i>Emulsifier</i> makanan	<i>Candida utilis</i>
	<i>Emulsifier</i> insektisida	<i>Pseudomonas tralucida</i>
	<i>Sulfated polysaccharide</i>	<i>Halomonas eurihalina</i>
	<i>Acetyl heteropolysaccharide</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
	Eksopolisakarida	<i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
N-asetil dan O-piruvil heteropolisakarida	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Berat molekul kecil	Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidea</i> <i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Hydroxyalkanoyloxy alcanoic acids (HAAs) Rhamnolipid precursor</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Trehalosa lipid	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i>
	Sophorosa lipid	<i>Candida lipolytica</i> <i>Torulopsis bombicola</i>
	Cellobiosa lipid	<i>Ustilago maydis</i>
	Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Surfaktin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilis</i>



Polymixin	<i>Bacillus polymyxa</i>
Gramicidin soviet	<i>Bacillus brevis</i>
Fosfolipid	<i>Acinetobacter</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Flavolipid	<i>Flavobacterium sp.</i>
Lipopeptida	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Acinetobacter sp.</i>
Ornithin peptida lisin	<i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Streptomyces tendae</i>
Polyolipid	<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula graminis</i>
Serrawetin	<i>Serratia marcescens</i>
Asam lemak	<i>Nocardia erythropolis</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i> <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>
Sulfonolipid	<i>Corynebacterium</i>
Diglikosil digliserida	<i>Rhizobium trifolii</i>

Sumber: Hamme *et al.*, 2006

Pada penelitian terdahulu, Ni'matuzahroh *et al.* (2003) dan Ni'matuzahroh *et al.* (2009), telah mendapat beberapa jenis biosurfaktan potensial dari bakteri hidrokarbonoklastik. Diantaranya adalah biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* 3KP dan biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter sp.* P2(1). Biosurfaktan dari isolat lokal *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat molase dengan konsentrasi 2 g/l mampu menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur mencapai 31,1 dyne/cm Stabil terhadap perubahan pH (4 – 8), suhu (25 – 65 °C), dan kadar garam (0 – 4 M) Setelah dilakukan pemurnian sampai pada tahap kromatografi kolom penukar ion diperoleh produk biosurfaktan dengan nilai CMC ± 3,7948 g /L (Yuliani, 2004 ; Ulum, 2004). Sementara itu, pruduk kasar biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dapat menurunkan tegangan permukaan sebesar 27,25 dyne/cm (dari 61,67 dyne/cm menjadi 34,42 dyne/cm), serta mempunyai nilai CMC produk kasar sebesar 10,4279 g/L (Widodo, 2010).





Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme hidrokarbonoklastik atau mikroba pendegradasi hidrokarbon berfungsi untuk meningkatkan daerah interfasial dan kontak pengambilan substrat. Hal tersebut berkaitan dengan sifat biosurfaktan yang memiliki dua molekul kompleks sekaligus yaitu gugus hidrofilik dan hidrofobik, sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan pada ruang antar air dan minyak (Vater *et al.*, 2002).

### 2.3.3 Aplikasi biosurfaktan dalam industri minyak

Aplikasi biosurfaktan dalam industri minyak terutama berkaitan dengan penanganan kasus – kasus limbah minyak (Desai dan Banat, 1997; Bordoloi dan Konwar, 2008). Penambahan biosurfaktan pada limbah minyak diharapkan mampu meningkatkan kelarutan hidrokarbon sehingga dapat didegradasi hingga pada batas aman bagi lingkungan. Hasil penelitian terdahulu menyebutkan bahwa penambahan biosurfaktan *Pseudomonas putida* T1(8) dalam bioremediasi tanah tercemar minyak mentah, mampu membantu menurunkan kadar minyak hingga 50% hanya dalam waktu 30 hari inkubasi. Sementara itu, pada uji mobilisasi minyak mentah menggunakan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dengan metode *sand pack column*, diperoleh hasil bahwa biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) mempunyai efektivitas daya mobilisasi minyak sebesar 48,62% pada konsentrasi sama dengan CMC (= CMC) dan waktu inkubasi 24 jam (Ni'matuzahroh *et al.*, 2009). Pada penelitian Qin *et al.* (2005), penambahan biosurfaktan B101 mampu memisahkan *sludge* dan minyak hingga 81,69% setelah dishaker selama 72 jam. Efektivitas penggunaan biosurfaktan dalam industri minyak selain dipengaruhi oleh karakteristik biosurfaktan dan jenis mikroba penghasil biosurfaktan seperti yang telah dijelaskan di atas, juga dipengaruhi oleh konsentrasi biosurfaktan yang digunakan.

### 2.3.4 Konsentrasi biosurfaktan untuk keperluan aplikasi

Kemampuan biosurfaktan untuk keperluan aplikasi dipengaruhi oleh konsentrasi biosurfaktan yang dinyatakan dengan nilai *Critical Micelle Concentration* (CMC). Pada konsentrasi di bawah CMC, biosurfaktan berada dalam bentuk monomer atau molekul tunggal. Meskipun pada konsentrasi ini biosurfaktan belum mampu membentuk misel, tapi biosurfaktan dalam bentuk monomer atau molekul tunggal kemungkinan tetap dapat berinteraksi dengan komponen organik (hidrokarbon minyak), dan meningkatkan dispersinya. Pada konsentrasi sama dengan CMC, kemampuan biosurfaktan dalam membentuk misel memungkinkan biosurfaktan untuk mengemulsi (memecah molekul hidrokarbon minyak yang kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana). Pada



konsentrasi di atas CMC, komposisi antara biosurfaktan dalam bentuk monomer dan misel dijumpai secara seimbang. Pada beberapa uji kemampuan biosurfaktan, seringkali digunakan variasi dari ketiga konsentrasi biosurfaktan (di bawah CMC, pada CMC, dan di atas CMC) tersebut (Rouse *et al.*, 1994).

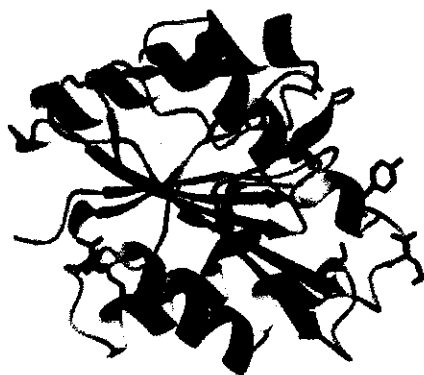
Kemampuan biosurfaktan dalam meningkatkan dispersi dan emulsi hidrokarbon minyak akan memacu solubilisasi atau kelarutan hidrokarbon minyak. Sifat inilah yang terus dikembangkan seiring dengan pengembangan detergen modern yang ramah lingkungan. Dewasa ini, detergen modern merupakan formulasi kompleks yang terdiri atas biosurfaktan selaku komponen utama, ditambah dengan *builders*, *bleaching agents*, enzim, dan komponen – komponen lainnya. Kombinasi biosurfaktan dengan faktor lain seperti enzim, diharapkan dapat berfungsi sinergis dalam meningkatkan aktivitas detergensi untuk menangani kasus – kasus limbah minyak. Salah satu kelompok enzim yang dapat berperan penting untuk meningkatkan detergensi adalah enzim lipase (Jurado *et al.*, 2007).

## **2.4. Tinjauan tentang Enzim Lipase**

### **2.4.1. Definisi enzim lipase**

Lipase merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan secara alami mengkatalis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut air (Miller *et al.*, 2010). Lipid merupakan senyawa organik hasil dari dehidrogenasi endotermal rangkaian hidrokarbon. Adapun senyawa-senyawa yang termasuk golongan lipid, di antaranya lemak, fosfolipid, steroid, asam lemak dan turunannya seperti triasilgliserol (Campbell *et al.*, 1998; Oxtoby *et al.*, 2003). Produk hidrolisis triasilgliserol oleh lipase berupa asam lemak yang telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri, antara lain: obat-obatan, kosmetika, pestisida, biosurfaktan, flavor, senyawa adaptif makanan, dan detergen. Lipase juga memiliki peran yang sangat penting dalam bidang bioteknologi karena kestabilannya yang tinggi pada media organik dan pada temperatur tinggi, serta mampu mengkatalis reaksi hidrolisis dan sintesis dengan berbagai substrat sintetik. Oleh karena itu, lipase banyak digunakan sebagai katalis untuk memperoleh senyawa monogliserida dan digliserida (Sihotang dan Ginting, 2006).





Gambar 2.1 Struktur enzim lipase dari *Bacillus subtilis* (Reetz *et al.*, 2006)

## 2.4.2 Sifat – sifat enzim lipase

### a. Berat molekul enzim

Hasil penelitian oleh Hiol *et al.* (2000) menyebutkan bahwa lipase dari *Rhizopus oryzae* memiliki berat molekul 32 kDa. Sedangkan menurut hasil penelitian Chahinian (2000) *P. cyclopium* menghasilkan lipase dengan berat molekul 37 kDa.

### b. pH optimum

Berdasarkan hasil penelitian Hasnunidah dan Sumardi (2009) lipase ekstraseluler dari *Bacillus sp.* optimum pada pH 7. Lipase ekstraseluler dari *Aspergillus oryzae* optimum pada pH 6,8 dan 10. Sedangkan lipase dari *R. oryzae* menunjukkan aktivitas optimal pada 7,5 dan stabil pada kisaran pH 4,5 – 7,5 (Sharma *et al.*, 2001).

### c. Suhu optimum

Lipase dari *Bacillus sp.* stabil pada suhu 50 °C (Hasnunidah dan Sumardi, 2009). Sedangkan hasil penelitian Sharma *et al.* (2001) lipase dari *P.aeruginosa* stabil pada suhu 45 °C dan *R. oryzae* stabil pada suhu 35 °C.

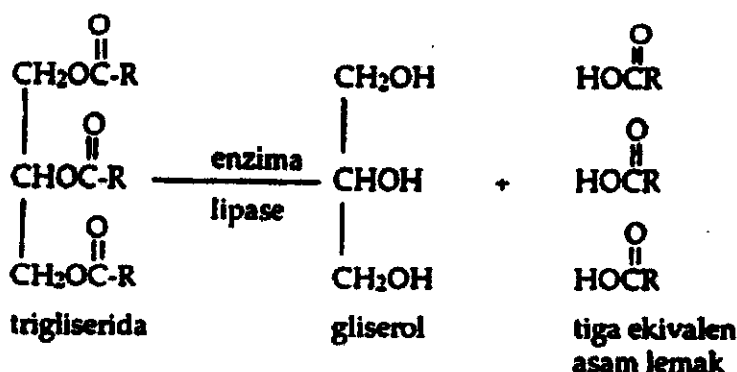
## 2.4.3 Aktivitas enzim lipase

Lipase dari berbagai sumber memperlihatkan spesifisitas yang berbeda-beda. Dari sisi asam lemak, beberapa lipase mempunyai afinitas terhadap asam-asam lemak rantai pendek (asam asetat, butirrat, kaprat, kaproat, kaprilat, dan sebagainya). Sedangkan beberapa lipase lain yang tidak spesifik, memutus asam lemak trigliserida secara acak.

Pada kondisi alami, lipase berinteraksi dengan substrat pada antar muka (*interface*) air / minyak, yaitu antara fasa substrat tak larut air (fasa organik) dan fasa air dimana enzim terlarut. Banyaknya yang ada pada antar muka menentukan aktiitas lipase. Luas antar muka dapat ditingkatkan hingga batas kejenuhannya dengan menggunakan *emulsifier*



atau pengocokan. Lipase mengkatalis reaksi hidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, gliserol, dan asam lemak.



Gambar 2.2 Reaksi hidrolisis minyak oleh lipase  
(Hartomo dan Widiatmoko, 1993)

#### 2.4.4. Aplikasi enzim lipase

Lipase merupakan kelompok biokatalis yang paling penting dalam aplikasi bioteknologi. Hasan *et al.* (2006) menjelaskan beragam aplikasi industri dari lipase mikrobial dalam industri deterjen, makanan, industri perasa, pemisahan biokatalitik dari farmasi, turunan ester dan asam amino, pembuatan bahan kimia yang halus, agrokimia, digunakan sebagai biosensor, bioremediasi, kosmetik dan parfum.

#### 2.5. Aktivitas lipolitik mikroba hidrokarbonoklastik

Kelompok mikroba yang mampu menggunakan sumber karbon dari senyawa hidrokarbon disebut hidrokarbonoklastik. Karakter mikroba ini yang tidak dimiliki bakteri lain adalah kemampuannya dalam mengekspresikan  $\omega$ -hidroksilase yaitu suatu enzim pengoksidasi hidrokarbon. Mikroba yang memiliki enzim ini mempunyai kemampuan untuk menempel pada hidrokarbon, memproduksi emulsifier serta membebaskan diri (*desorption*) dari hidrokarbon. Beberapa golongan mikroba menguraikan hidrokarbon dengan jalur oksidasi yang mengubah senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana (Desai and Banat, 1997). Kemampuan inilah yang disebut dengan aktivitas lipolitik mikroba hidrokarbonoklastik.

#### 2.6. Tinjauan tentang Uji Solubilisasi *Oil Sludge*

Uji solubilisasi dapat diamati dengan melakukan uji agitasi dan uji emulsi. Menurut Qin *et al.* (2005), uji kemampuan biosurfaktan dalam melarutkan komponen hidrokarbon dalam *sludge* dengan agitasi dapat dilakukan dengan cara menambahkan larutan





biosurfaktan sebanyak 100 ml ke dalam 10 gram *oil sludge*, yang selanjutnya dishaker atau diagitasi pada suhu 25-28°C selama waktu inkubasi 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Pada tiap waktu inkubasi, campuran dipisahkan menjadi *sludge* dan minyak. Batas antara *sludge* dan minyak akan terlihat sangat jelas. Minyak yang telah terpisah dari *sludge* akan mengapung pada bagian permukaan cairan.

Emulsi adalah suatu sistem yang secara termodinamik tidak stabil, terdiri dari paling sedikit dua fase yang tidak bercampur, satu diantaranya terdispersi sebagai globul – globul dalam fase cair yang lainnya. Uji kelarutan biosurfaktan melalui emulsi didasarkan pada kemampuan terbentuknya emulsi yang ditandai dengan adanya dispersi fase cair menjadi butiran – butiran mikroskopik dalam fase cair yang lainnya (Desai dan Banat, 1997).

Berdasarkan fase terdispersinya dikenal dua jenis emulsi, yaitu:

- a. Emulsi minyak dalam air yaitu apabila fase minyak terdispersi di dalam fase air,
- b. Emulsi air dalam minyak yaitu bila fase air terdispersi di dalam fase minyak



## **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

### **3.1. TUJUAN PENELITIAN**

1. Mengetahui interaksi antara jenis biosurfaktan dan jenis enzim lipase dalam solubilisasi hidrokarbon pada *oil sludge* ?
2. Mengetahui interaksi antara konsentrasi biosurfaktan dan konsentrasi enzim lipase dalam solubilisasi hidrokarbon pada *oil sludge* ?
3. Mengetahui interaksi kombinasi jenis dan konsentrasi biosurfaktan terhadap jenis dan konsentrasi enzim lipase dalam solubilisasi hidrokarbon pada *oil sludge*
4. Mengetahui kombinasi yang dapat menghasilkan solubilisasi *oil sludge* tertinggi?

### **3.2. MANFAAT PENELITIAN**

1. Penelitian ini akan menghasilkan formulasi biosurfaktan-enzim yang dapat meningkatkan aktivitas solubilisasi *oil sludge* .
2. Data penelitian diharapkan dapat dipakai sebagai acuan untuk upaya pengolahan limbah *oil sludge* pada industri minyak.
3. Hasil penelitian akan dipublikasikan di jurnal nasional terakreditasi di Indonesia yang terkait dengan mikrobiologi terapan, mikrobiologi industri, fisiologi mikroba, biokonversi, dan potensi biodiversitas mikroba Indonesia.



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

#### 4.1.1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya.

#### 4.1.2. Waktu

Penelitian dilaksanakan selama delapan bulan.

### 4.2. Bahan dan Alat

#### 4.2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi:

- a. Media pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan dan *crude enzyme*  
*Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Bushnell-Haas mineral salts medium*, air mineral sintetis (AMS) komposisi dari Pruthi dan Cameotra (1997), akuades, minyak goreng dan molase.
- b. Media selektif bakteri penghasil *crude enzyme* lipase  
*Media Rhodamine-B plate agar*
- c. Bahan kimia  
CaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, HCl, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KOH, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>M<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, asam bikromat, alkohol, buffer fosfat pH 7, *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP), paper disk, *Rhodamine-B*, Tween-80 dan Tween-20.
- d. Bahan uji kelarutan *oil sludge*  
*Oil sludge*, hidrokarbon uji (kerosin), minyak emersi, es batu, aluminium foil, *cling wrap*, kapas, kertas koran, kertas saring Whatman no. 1 dengan diameter 110 mm, label, selotip dan spiritus.

#### 4.2.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* Ogawa Seiki, bak plastik, botol kultur, botol semprot, botol fial, cawan Petri, corong, Erlenmeyer, *freeze dryer*, gelas ukur, gelas *Beaker*, jangka sorong, jarum ose *loop*, kompor listrik, kuvet, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari es, mikropipet, *magnetic stirrer* MG-78-1, neraca analitik Shimadzu AEL-200, oven, indikator pH fix 1-14 Macherey-Nagel, pinset, pipet volume,



pembakar bunsen, rak tabung reaksi, sentrifuge *Beckman*, *shaker incubator*, spektrofotometer UV-Vis, spatula besi, spatula kaca, spektrofotometer (spectronic 20 Bausch-Lomb), tabung Eppendorf, tabung reaksi, tensiometer Du-Nouy, tip mikropipet, *vortex* dan *waterbath*.

### 4.3. Cara Kerja

#### 4.3.1. Penyediaan stok bakteri

Isolat bakteri yang digunakan merupakan koleksi laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya. Isolat bakteri terdiri atas *Bacillus subtilis* 3KP, penghasil biosurfaktan yang diisolasi dari perairan "Kali Donan" Cilacap Jawa Tengah dan *Acinetobacter sp.* P2(1), penghasil biosurfaktan yang diisolasi dari tanah tercemar minyak mentah di desa Wonocolo Kecamatan Kedewan Bojonegoro, Jawa Timur. Sementara itu, isolat mikroba penghasil enzim lipase diisolasi dari penambangan minyak mentah tradisional Desa Wonocolo Kecamatan Kedewan Bojonegoro Jawa Timur dan dari lumpur minyak (*oil sludge*) di kawasan pengilangan minyak di Pertamina VI Balongan.

#### 4.3.2. Pembuatan media untuk bakteri hidrokarbonoklastik

Sebanyak 2,8 gram NA dilarutkan ke dalam 100 ml akuades dan dimasak pada *hot plate* hingga mendidih. Kemudian media dituang ke dalam 20 tabung reaksi dimana masing-masing tabung diisi 5 ml NA. Tabung reaksi yang berisi NA selanjutnya disumbat dengan kapas dan ditutup dengan aluminium foil. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121° C, 1 atm, selama 20 menit. Tabung reaksi berisi NA yang telah disterilisasi selanjutnya dimiringkan dan didiamkan sampai media memadat.

#### 4.3.3. Peremajaan bakteri hidrokarbonoklastik

Peremajaan bakteri hidrokarbonoklastik dilakukan secara aseptik untuk menghindari kontaminasi. Sebanyak satu ose isolat bakteri *distreak* pada media NA miring. Selanjutnya isolat diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam.

#### 4.3.4. Skrining bakteri hidrokarbonoklastik penghasil lipase

##### a. Pembuatan media Bushnell Haas agar

Komposisi nutrisi 100 ml media Bushnell Haas agar meliputi:  $K_2HPO_4$  0,5 gram,  $KH_2PO_4$  0,5 gram,  $NH_4NO_3$  0,5 gram,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05 gram,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,02,  $FeCl_3$  0,01 gram, dan powder agar 2 gram.





### **b. Pembuatan medium uji (*rhodamine-B plate agar*)**

Medium uji (*rhodamine-B plate agar*) terdiri atas medium Busnell Haas agar yang mengandung minyak goreng dan rhodamin-B (Hou & Johnston, 1992). Ke dalam 20 ml Busnell Haas agar ditambahkan 0,6 ml (3%) minyak goreng dan 0,04 ml rhodamin-B 0,1% dalam H<sub>2</sub>O. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121° C, 1 atm, selama 20 menit. Setelah agak dingin, media dituang ke dalam cawan petri.

### **c. Penapisan bakteri hidrokarbonoklastik penghasil lipase**

Mikroba hidrokarbonoklastik diinokulasi sebagai spot kecil ke medium uji dan diinkubasi pada suhu 37 °C. Munculnya zona pendaran berwarna oranye kemerahan di sekitar koloni mikroba setelah inkubasi selama 48 jam menunjukkan adanya aktivitas lipolitik.

### **4.3.5. Uji aktivitas enzim terhadap *p*-nitrofenil palmitat**

Uji aktivitas enzim dilakukan pada isolat mikroba hidrokarbonoklastik yang memiliki indeks aktivitas lipolitik tertinggi.

#### **a. Pembuatan inokulum**

Disiapkan 20 ml medium NB dalam botol kultur dan diinokulasikan satu ose isolat mikroba terpilih. Kemudian inokulum diinkubasi dengan pengocokan 120 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Suspensi sel yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai inokulum pada kultivasi mikroba.

#### **b. Pembuatan medium Bushnell Haas cair**

Komposisi nutrisi 100 ml media Bushnell Haas cair meliputi: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 gram, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 gram, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,5 gram, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05 gram, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,02, dan FeCl<sub>3</sub> 0,01 gram.

#### **c. Kultivasi mikroba**

Disiapkan 24 buah botol kultur yang berisi medium 50 ml Bushnell Haas cair dan 1% minyak goreng. Ke dalam setiap labu dimasukkan 5% suspensi sel dengan A<sub>650</sub> = 0,1 dari isolat mikroba terpilih. Campuran dikultivasi dengan pengocokan 120 rpm pada suhu 37 °C selama 48 jam. Selama proses kultivasi berlangsung, setiap 4 jam sekali dilakukan penghitungan biomassa sel untuk membuat kurva pertumbuhan mikroba dan pengambilan supernatan untuk menentukan aktivitas lipolitik.

#### **d. Pembuatan kurva pertumbuhan mikroba**

Kurva pertumbuhan mikroba dibuat bersamaan dengan proses kultivasi mikroba. Setiap 4 jam sekali sebanyak 4 ml suspensi sel dari kultivasi diukur densitas optiknya (OD)



dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 650 \text{ nm}$ . Kemudian dilakukan penghitungan jumlah selnya dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan mikroba antara hasil penghitungan TPC dan densitas optik (OD).

#### e. Penentuan aktivitas enzim lipase

Aktivitas lipolitik *crude enzyme* lipase diukur secara kuantitatif dengan metode Pereira-Meirelles *et al.* (1997) dalam Sumarsih (2005) yang dimodifikasi. Aktivitas enzim ditentukan dengan metode spektrofotometrik dengan substrat *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP). Setiap 4 jam sekali sebanyak 20 ml medium kultur disentrifugasi pada 9.000 rpm dengan suhu 4° C selama 15 menit, sehingga terpisah antara supernatan dan suspensi sel. Supernatan yang diperoleh mengandung enzim lipase ekstraseluler.

Disiapkan dua tabung Eppendorf, tabung A untuk larutan blanko dan tabung B untuk larutan enzim lipase. Tahap pertama tabung A dan B diisi 700  $\mu$ l larutan *p*-NPP 0,503 mM dalam buffer fosfat pH 7.0. Tahap kedua pada tabung A ditambahkan 300 $\mu$ l akuades dan tabung B ditambahkan 300 $\mu$ l supernatan. Kemudian campuran diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 37° C selama 30 menit. Tahap ketiga tabung A dan B diangkat dari *waterbath* lalu ditambahkan 100 $\mu$ l larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M pada kedua tabung. *p*-nitrofenol yang terbentuk ditandai dengan warna kuning, kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda = 410 \text{ nm}$ . OD yang diperoleh selanjutnya akan digunakan untuk menetapkan nilai aktivitas enzim lipase. Pada penentuan aktivitas enzim lipase ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Uji kuantitatif ini dilakukan untuk menyatakan aktivitas lipolitik dari *crude enzyme* lipase dalam satuan Internasional Unit (IU) per liter. Satu unit (U) aktivitas lipase (aktivitas lipolitik) didefinisikan sebagai banyaknya enzim lipase yang menghidrolisis substrat uji *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) menjadi 1  $\mu$ mol produk *p*-nitrofenol per menit. Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Aktivitas lipase (U/ml)} = \frac{[P] \times 1000}{T \times V}$$

dengan:

- [P] = konsentrasi *p*-nitrofenol ( $\mu$ mol/ml)
- T = waktu inkubasi (menit)
- V = volume enzim (ml)



#### 4.3.6. Aktivitas emulsifikasi *crude enzyme* lipase

*Crude enzyme* lipase diukur nilai aktivitas emulsifikasi (%) pada minyak uji kerosin setelah 1 jam dan 24 jam. Nilai aktivitas emulsi diamati dengan mengukur tinggi fase emulsi (cm) terhadap tinggi total cairan (cm) dikali 100% (Pruthi dan Cameotra, 1997).

#### 4.3.7. Karakterisasi Enzim Lipase

Karakterisasi enzim lipase dilakukan dengan memproduksi enzim lipase pada inkubasi optimal yang selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas lipolitik pada pH dan suhu optimal enzim lipase tersebut. Penentuan pH optimal aktivitas enzim lipase dilakukan seperti cara penentuan aktivitas enzim lipase, tetapi substrat *p*-NPP dilarutkan pada buffer fosfat dengan variasi pH 5.0, 6.0, 7.0, dan 8.0. Penentuan suhu optimal aktivitas enzim lipase dilakukan seperti cara penentuan aktivitas enzim lipase, tetapi dilakukan variasi suhu inkubasi pada proses reaksi antara enzim lipase dengan substrat *p*-NPP, yakni 30, 40, 50, dan 60° C.

#### 4.3.8. Produksi enzim lipase

Disiapkan botol kultur yang berisi medium 50 ml medium Busnell Haas dan 1% substrat minyak goreng. Kemudian dimasukkan 5% suspensi sel dengan  $A_{650} = 0,1$  ke dalam medium dan dilakukan pengocokan 120 rpm. Lama kultivasi adalah waktu yang diperlukan mikroba terpilih untuk menghasilkan lipase secara optimal. Selanjutnya enzim lipase diekstrak dengan menggunakan ammonium sulfat.

#### 4.3.9. Produksi biosurfaktan

##### a. Pembuatan media air mineral sintetis.

Air mineral sintetis yang digunakan adalah air mineral sintetis komposisi dari Pruthi and Comeotra (1997) terdiri atas  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g), NaCl (10 g),  $\text{CaCl}_2$  (0,01 g),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,001 g),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,001 g),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,005 g),  $\text{Na}_2\text{M}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g) dilarutkan dalam 1 liter akuades. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan pengaduk magnetik dan pH larutan dibuat hingga mencapai pH 7,00 dengan menambahkan NaOH 4N atau HCl 1% ke dalam air mineral sintetis. Kemudian disterilkan dan ditambah stok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 g) dalam 50 ml akuades, dan stok  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1g) dalam 50 ml akuades.

##### b. Pembuatan stok *Bacillus subtilis* 3KP dan *Acinetobacter* sp.

Biakan murni *Bacillus subtilis* 3KP dan *Acinetobacter* sp diperbanyak dalam media *Nutrient Agar* (NA) miring yang dibuat dengan melarutkan NA (20 g/l) dan NaCl (10 g/l) dalam aquades. Bakteri ditanam dengan metode gores. Biakan bakteri diinkubasi selama



24 jam pada suhu 27 °C. Koloni yang tumbuh baik digunakan sebagai stok bakteri selama penelitian.

#### c. Perbanyak bakteri dalam *Nutrient Broth*.

Satu ose bakteri uji dari media agar miring diinokulasi ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml yang berisi 10 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang dibuat dengan melarutkan NB (8 gr/l) dan NaCl (10 g/l) dalam aquades. Kultur bakteri dalam *Nutrient Broth* diinkubasi selama 15 jam pada suhu 27 °C, selanjutnya kultur ditanam ke media kultur bakteri.

#### d. Pembuatan kultur bakteri.

Molase yang akan digunakan sebagai substrat produksi biosurfaktan diendapkan terlebih dahulu dengan cara menambahkan akuades (v/v) perbandingan (1:2) dan disimpan dalam kulkas selama ± 1 jam. Molase yang telah diendapkan tersebut diambil dengan hati-hati menggunakan pipet volume.

Molase dengan konsentrasi 3% (v/v) dilarutkan dalam air mineral sintesis seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Media tersebut dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Nilai pH awal media diukur, jika terlalu asam ditambahkan larutan KOH dan jika terlalu basa ditambahkan larutan HCl hingga mencapai pH 7 (Ulum, 2004). Media disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit, kemudian diinkubasi pada suhu 27- 30°C. Selanjutnya, suspensi bakteri dari media *Nutrient Broth* (NB) yang memiliki nilai absorbansi 0,9 pada  $\lambda_{610 \text{ nm}}$  sebanyak 2% (v/v) ditambahkan ke dalam kultur. Kultur bakteri diinkubasi dengan *shaker incubator* pada suhu 27-30°C dan agitasi 120 rpm selama 4 hari.

#### e. Ekstraksi biosurfaktan.

Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dan *Acinetobacter sp.* diekstraksi dari supernatan kultur dengan cara pengendapan menggunakan amonium sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% jenuh. Supernatan kultur sebanyak ± 20 mL dimasukkan ke dalam gelas *Beaker* 100 mL dan direndam dalam penangas es. Amonium sulfat 60% jenuh (130 g/L) secara perlahan dimasukkan ke dalam gelas *Beaker* sambil diaduk dalam keadaan terendam es selama 15 menit, kemudian dilakukan sentrifugasi. Perolehan residu diliofilisasi dengan menggunakan *freeze dryer* sehingga menjadi serbuk biosurfaktan yang digunakan untuk uji kelarutan *oil sludge*. Serbuk tersebut kemudian ditimbang dengan neraca analitik untuk memperoleh berat kering produk kasar biosurfaktan (Yuliani, 2004).





#### 4.3.10. Pembuatan larutan biosurfaktan konsentrasi sama dengan CMC (*Critical Micelle Concentration*), di bawah CMC, dan di atas CMC

Setelah diperoleh nilai CMC, maka dilakukan pemilihan konsentrasi di bawah CMC dan di atas CMC yang akan digunakan untuk uji solubilisasi *sludge oil*. Selanjutnya dari tiap – tiap konsentrasi ditambahkan ke dalam perlakuan dalam bentuk serbuk yang dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7. Konsentrasi sama dengan CMC dari biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* 3KP adalah 16 g/L (Yuliani, 2004). Sedangkan konsentrasi sama dengan CMC dari biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter sp.* adalah 10,4279 g/L (Widodo, 2010). Larutan tersebut sebelumnya dikarakterisasi dengan cara mengukur nilai tegangan permukaan (mN/m) dan aktivitas emulsifikasinya (%).

#### 4.3.11 Uji solubilisasi *oil sludge*

##### a. Persiapan *Oil Sludge* dalam Tabung Reaksi untuk Perlakuan

*Oil sludge* terlebih dahulu dipanaskan di atas pembakar bunsen agar mencair dan dapat dipipet untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi sebelum dan sesudah dimasukkan *oil sludge* ditimbang hingga diperoleh berat *oil sludge*  $\pm$  0,20 g dalam tabung reaksi. Berat *oil sludge* perlakuan dicatat sebagai Wop.

##### b. Perlakuan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga kali ulangan. Perlakuan terdiri dari empat faktor, yaitu jenis biosurfaktan, konsentrasi biosurfaktan, jenis enzim, dan konsentrasi enzim. Jenis biosurfaktan yang digunakan adalah biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter sp* dan *Bacillus subtilis* 3KP yang selanjutnya diberi kode (BA dan BB). Konsentrasi biosurfaktan yang digunakan adalah konsentrasi 0, konsentrasi di bawah CMC (<CMC), konsentrasi sama dengan CMC (=CMC), dan konsentrasi lebih dari CMC (>CMC). Sedangkan jenis enzim yang digunakan adalah enzim lipase dari tiga isolat bakteri hidrokarbonoklastik *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.* dan *Actinobacillus sp.* yang selanjutnya diberi kode (EA, EB, dan EC). Konsentrasi enzim yang digunakan adalah konsentrasi enzim dengan 4 variasi konsentrasi (konsentrasi 0, 1, 2, dan 3). Volume biosurfaktan maupun enzim yang ditambahkan dalam perlakuan adalah hingga mencapai 6 ml. Seluruh perlakuan divortex pada suhu ruangan (27-30<sup>0</sup>C) selama 15 menit. Rincian perlakuannya adalah sebagai berikut:



Tabel 5.1 Kombinasi perlakuan penelitian

Jenis Biosurfaktan	Konsentrasi	EA (Enzim <i>Micrococcus</i> sp. LII 61 )						EB (Enzim <i>Bacillus</i> sp. LII 63B)						EC (Enzim <i>Actinobacillus</i> sp. P3-7)											
		0		1		2		3		0		1		2		3		0		1		2		3	
		EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
BA (Biosurfaktan <i>Acinetobacter</i> sp.)	0	EA0-EA0	EA0-EA1	EA0-EA2	EA0-EA3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3
	<CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
	=CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
	>CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
	0	EA0-EA0	EA0-EA1	EA0-EA2	EA0-EA3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3
	<CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
BB (Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP)	0	EA0-EA0	EA0-EA1	EA0-EA2	EA0-EA3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3
	<CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
	=CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
	>CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3
	0	EA0-EA0	EA0-EA1	EA0-EA2	EA0-EA3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3	EA0-EC0	EA0-EC1	EA0-EC2	EA0-EC3	EA0-EB0	EA0-EB1	EA0-EB2	EA0-EB3
	<CMC	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3	EA0	EA1	EA2	EA3



### c. Pengukuran solubilisasi *oil sludge*.

Kelarutan *oil sludge* diuji dengan metode filtrasi. *Oil sludge* dalam tabung reaksi yang terlarut, dipisahkan terlebih dahulu dari *oil sludge* yang masih dalam bentuk padatan dan tidak terlarut, yaitu dengan cara diambil secara hati-hati menggunakan pipet tetes. Lalu, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Dari hasil sentrifugasi tersebut diambil sampel sebanyak 1 mL dan difiltrasi menggunakan kertas saring Whatmann no. 1 dengan diameter 110 mm yang diletakkan dalam corong bebas lemak.

Kertas saring tersebut dibungkus dengan *aluminium foil* yang sebelumnya telah ditimbang dengan neraca analitik dan dicatat beratnya sebagai  $W_o$ . Kemudian, kertas saring dioven pada suhu 51-55 °C selama 28 menit. Lalu, kertas saring kembali ditimbang dan dicatat beratnya sebagai  $W_t$ . Semua perlakuan dan kontrol yang dilakukan dalam uji kelarutan *oil sludge* ini harus dilakukan secara bebas lemak. Kertas saring yang digunakan tidak boleh dipegang secara langsung dengan tangan, akan tetapi dengan pinset yang juga bebas lemak.

Beberapa faktor dapat mempengaruhi pengukuran dari berat *oil sludge* yang terlarut. Substansi yang terkandung dalam biosurfaktan dan enzim yang digunakan pada perlakuan ikut serta mempengaruhi berat akhir kertas saring. Sehingga diperlukan adanya blanko untuk mendapatkan hasil kelarutan *oil sludge* yang valid. Blanko merupakan berat larutan biosurfaktan ataupun enzim tanpa penambahan *oil sludge* yang difiltrasi sama seperti perlakuan lainnya.

### d. Nilai Persentase Kelarutan *Oil Sludge* (%)

Nilai persentase kelarutan *oil sludge* pada masing- masing perlakuan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kelarutan } Oil \text{ sludge} = \frac{W_{ot}}{W_{op}} \times 100\%$$

Dimana:

$W_{ot}$  = berat *oil sludge* terlarut (g).

$W_{op}$  = berat *oil sludge* perlakuan (g).

Sedangkan berat *oil sludge* terlarut dihitung menggunakan rumus berikut :

$$W_{ot} = (W_t - W_o) \times \text{Volume total}$$

Dimana:

$W_{ot}$  = berat *oil sludge* terlarut (g).

$W_t$  = berat kertas saring + *oil sludge* terlarut (g/ mL).

$W_o$  = berat kertas saring (g).



#### 4.4 Analisis Data

Data yang didapat dari penelitian ini adalah karakteristik enzim lipase dari bakteri hidrokarbonoklastik. Serta data kelarutan *oil sludge* (%) pada kombinasi jenis biosurfaktan, konsentrasi biosurfaktan, jenis enzim, dan konsentrasi enzim.

Data diameter zona *halo* dari *crude enzyme* lipase dari bakteri hidrokarbonoklastik pada berbagai media produksi dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui adanya ekspresi enzim lipase. Data kelarutan *oil sludge* (%) dianalisis secara statistik, langkah pertama data diuji berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji *One sample Kolmogorov-Smirnov*. Untuk menguji asumsi data memiliki varians bersifat homogen atau tidak, digunakan uji *Lavene test*. Bila data kelarutan *oil sludge* (%) berdistribusi normal dan memiliki varians homogen, maka dapat dilanjutkan dengan uji *One-way Analysis of Varians* (ANOVA) pada program *Statistical Package For Social Science* (SPSS) untuk mengetahui adanya beda signifikan pada masing- masing perlakuan yang diberikan. Dan jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji Duncan pada derajat signifikansi ( $\alpha$ ) 5%.

#### 4.5. JADWAL WAKTU PELAKSANAAN

Kegiatan/Bulan	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Persiapan dan konsolidasi tim	■							
2. Peremajaan bakteri, dan pembuatan media pertumbuhan	■							
3. Skrining produksi lipase bakteri hidrokarbonoklastik		■						
4. Uji aktivitas enzim terhadap <i>p</i> -nitrofenil palmitat			■					
5. Aktivitas emulsifikasi <i>crude enzyme</i> lipase			■					
6. Karakterisasi Enzim Lipase				■				
7. Produksi enzim lipase				■				
8. Produksi biosurfaktan				■				
9. Uji solubilisasi <i>oil sludge</i>					■	■		
10. Pengumpulan data		■	■	■	■	■		
11. Analisa data		■	■	■	■	■	■	
12. Penyusunan laporan							■	
13. Seminar akhir								■
14. Perbaikan laporan								■





## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Hasil Penelitian

Biosurfaktan yang diujikan pada penelitian ini adalah produk dari bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) dan *Bacillus subtilis* 3KP pada substrat molase. Karakteristik supernatan dua kultur bakteri penghasil biosurfaktan yang diujikan disajikan pada tabel 5.1. Sedangkan perolehan produk kasar biosurfaktan dari masing-masing bakteri beserta nilai CMC disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.1. Produksi biosurfaktan dan uji karakteristik biosurfaktan tiga bakteri (*Acinetobacter* sp. P2(1) dan *Bacillus subtilis* 3KP)

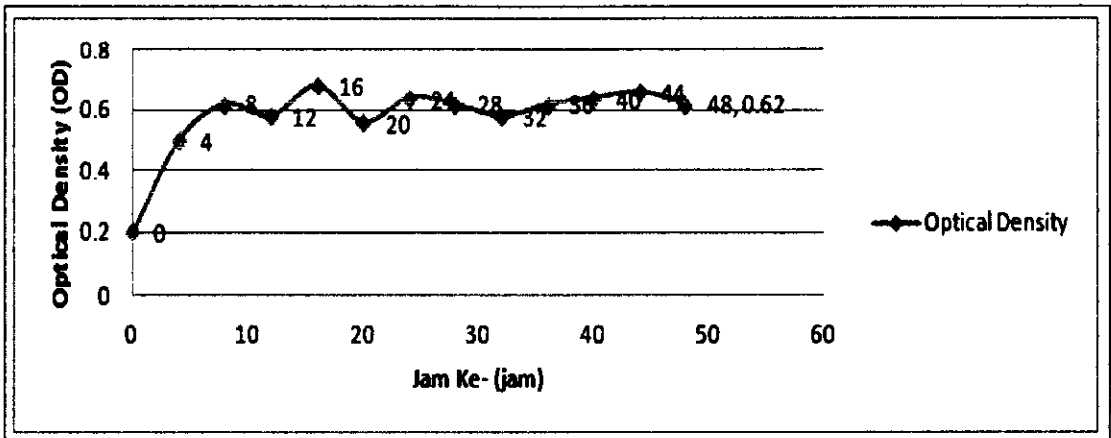
No	Jenis bakteri	pH kultur	Parameter uji biosurfaktan					
			Tegangan Permukaan (TP) mN/m		Aktivitas Emulfisikasi (AE) (%)			
			TP Supernatan Kultur	Penurunan TP dibanding kontrol	Kerosen (1jam)	Kerosen (24 jam)	Solar 1 jam	Solar 24 jam
1.	<i>Acinetobacter</i> sp. P2(1)	5.2	45,1	17,2	56,4	53,9	36,8	36,6
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 3KP	5.2	43,9	20,5	30,4	28,4	20,3	18,3

Tabel 5.2. Perolehan produk dan nilai CMC biosurfaktan dari bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) dan *Bacillus subtilis* 3KP

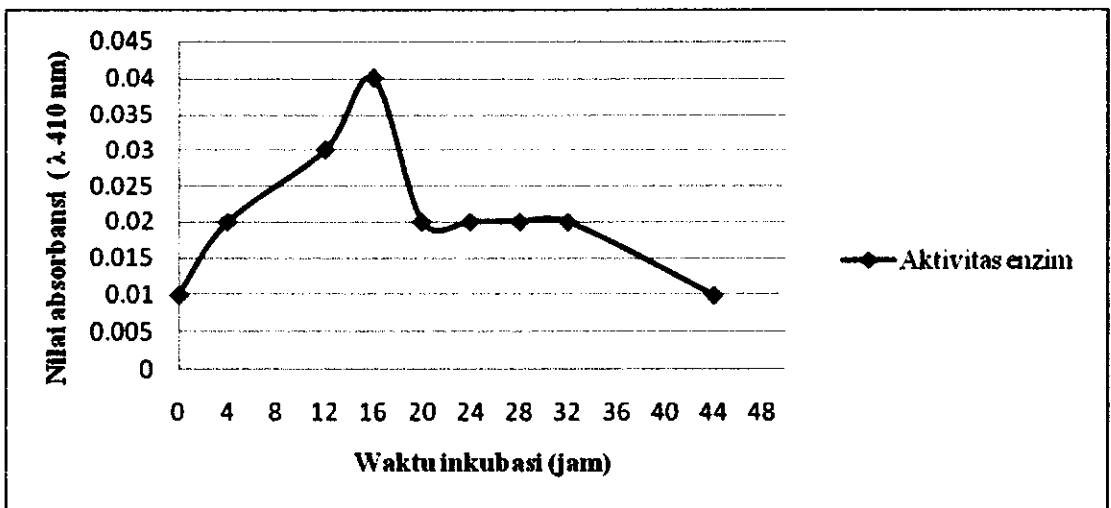
No.	Jenis Biosurfaktan	Substrat	Perolehan produk biosurfaktan (g/L)	Nilai CMC (g/L)
1.	<i>Acinetobacter</i> sp. P2(1)	Molase	13,45 g/L	6,78 ± 2,18 g/L.
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 3KP	Molase	16 g/L	10 g/L

Enzim lipase yang digunakan sebagai sumber enzim terdiri dari tiga bakteri hidrokarbonoklastik yaitu *Micrococcus* sp. LII 61, *Bacillus subtilis* LII 63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7. Hasil pengukuran aktivitas enzim tiga bakteri yang diukur menggunakan metode spektrofotometri disajikan berturut turut pada Gambar 1, 2, dan 3. Sedangkan, nilai aktivitas enzim dari masing-masing bakteri pada waktu yang ditentukan yaitu 16 jam waktu inkubasi disajikan pada Tabel 5.3.

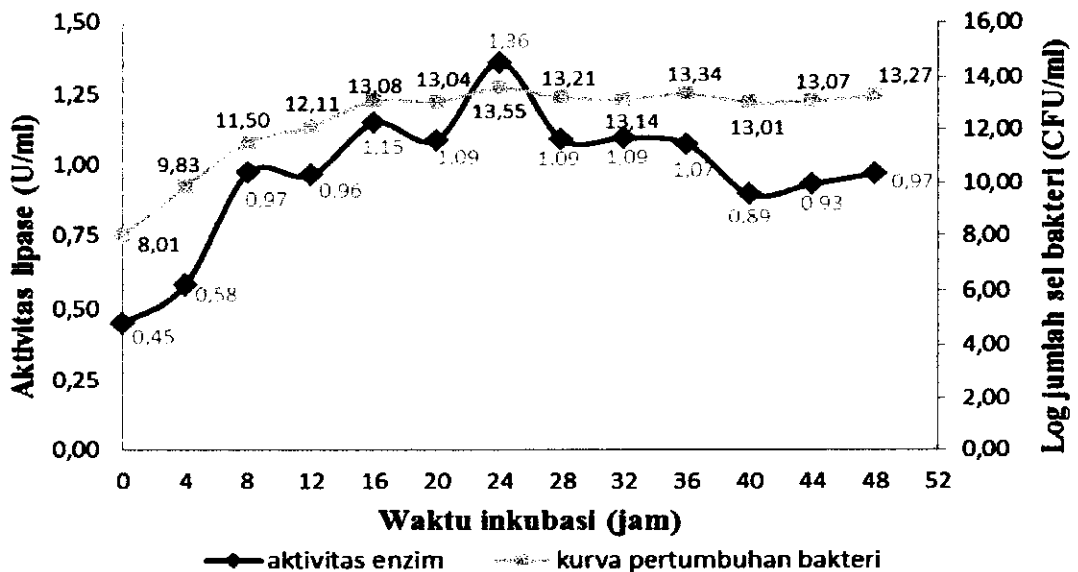




Gambar 5.1. Hasil uji aktivitas enzim lipase supernatan kultur *Micrococcus sp.* L II 61



Gambar 5.2. Grafik aktivitas enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B



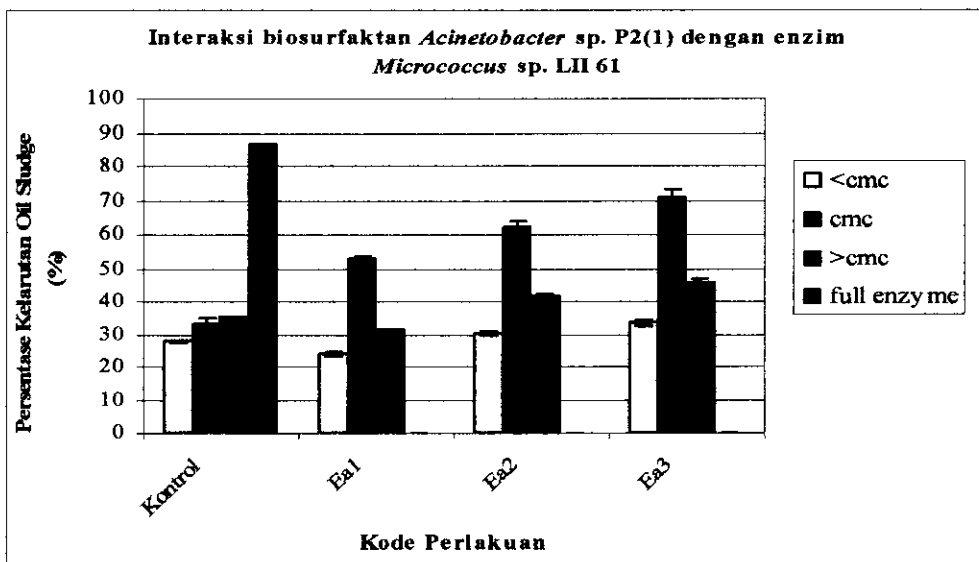
Gambar 5.3. Pertumbuhan dan aktivitas lipolitik bakteri *Actinobacillus sp.* pada media Busnell Haas + minyak goreng 1%



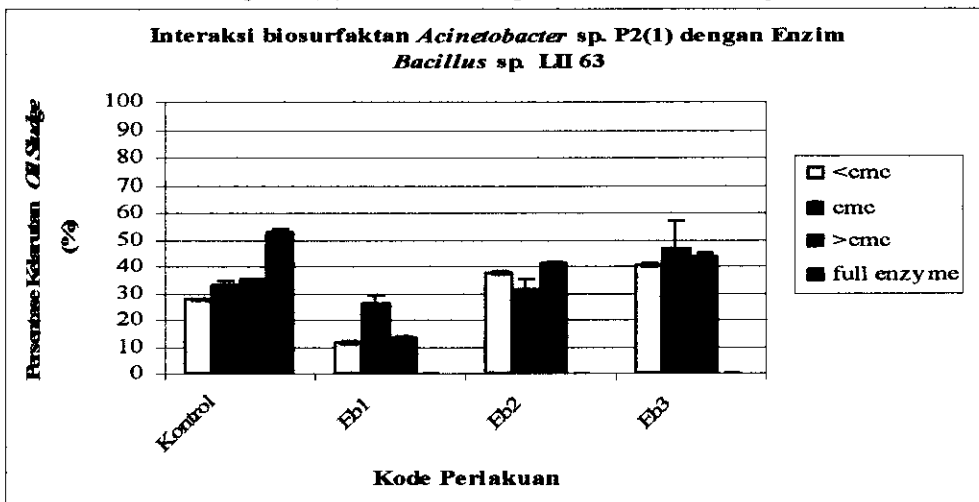
Tabel 5.3. Nilai aktivitas enzim lipolitik tiga jenis bakteri pada 16 jam inkubasi

No.	Supernatan bakteri	Nilai aktivitas enzim lipolitik	Tegangan permukaan supernatan kultur (mN/m)	Aktivitas emulsifikasi (%)	
				1 jam	24 jam
1.	<i>Micrococcus</i> sp. LII 61	33,53 U/mL	41,73 ± 1,17 mN/m	20,24±0,68	17,31±1,19
2.	<i>Bacillus</i> sp. LII 63B	11,55 U/mL.	49,27 ± 0,55 mN/m	10,49±1,33	0 ± 0
3.	<i>Actinobacillus</i> sp. P3-7	1,15 U/mL	71.96 mN/m	0	0

Persentase kelarutan *oil sludge* dengan variasi kombinasi jenis biosurfaktan dan enzim lipase disajikan berturut – turut dibawah ini.

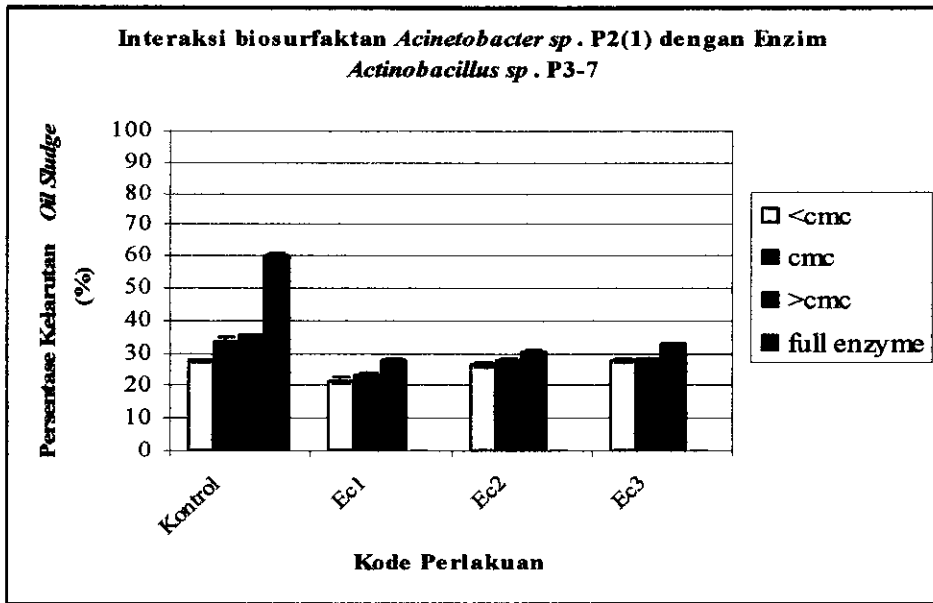


Gambar 5.4. Persentase *oil sludge* terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dan enzim lipase *Micrococcus* sp. LII 61

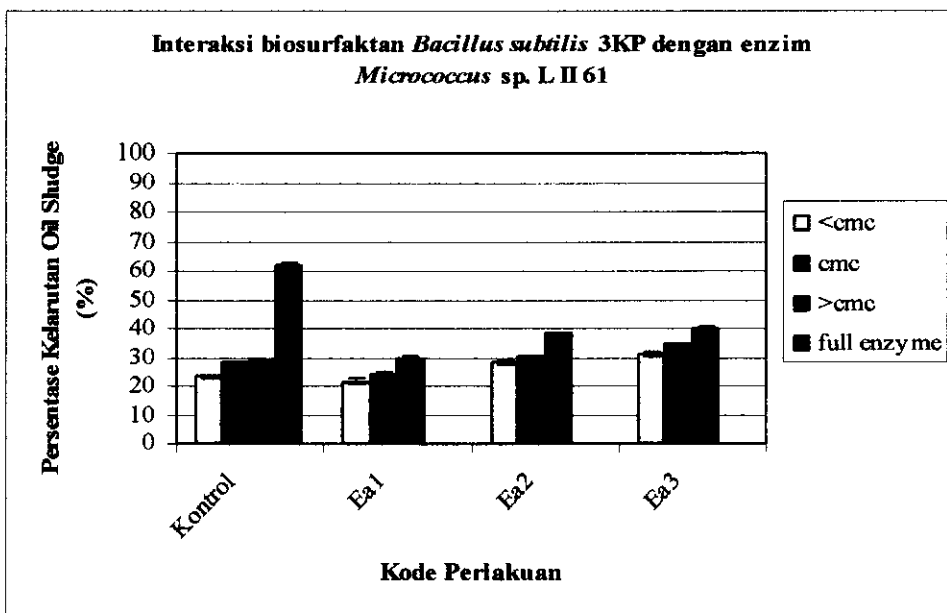


Gambar 5.5. Persentase *oil sludge* terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dan enzim lipase *Bacillus* sp. LII 63B





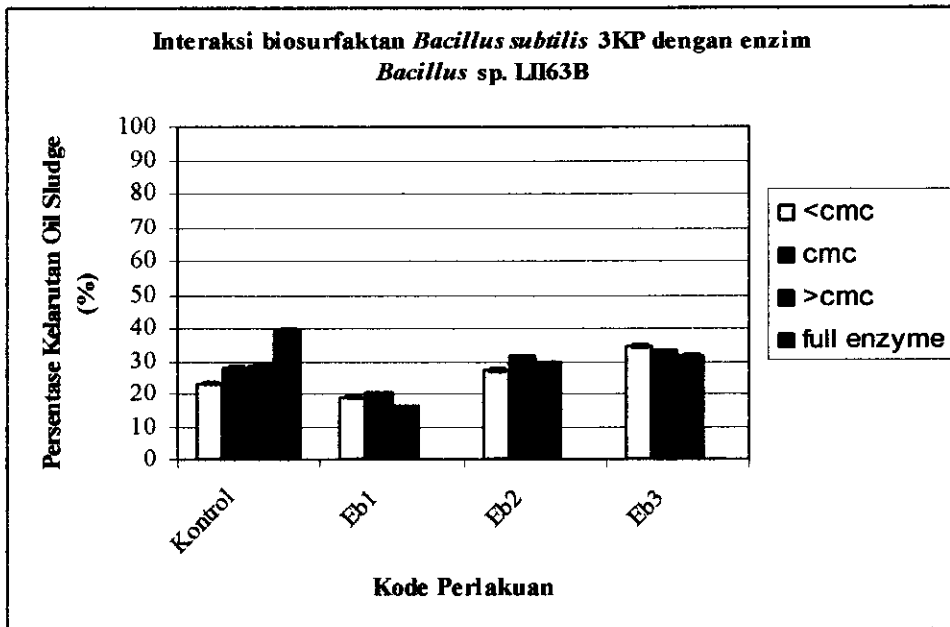
Gambar 5.6. Persentase *oil sludge* terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan enzim lipase *Actinobacillus sp.* P3-7



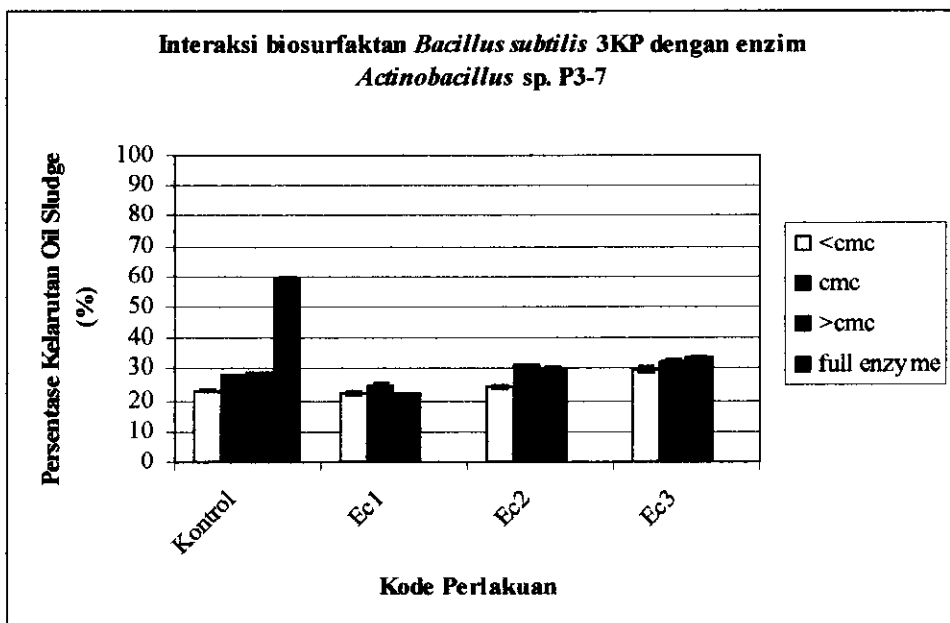
Gambar 5.7. Persentase *oil sludge* terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dan enzim lipase *Micrococcus sp.* LII 61







Gambar 5.8. Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dan enzim lipase *Bacillus sp.* LII 63B



Gambar 5.9. Persentase oil sludge terlarut hasil interaksi konsentrasi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dan enzim lipase *Actinobacillus sp.* P3-7



## 5.2. Pembahasan

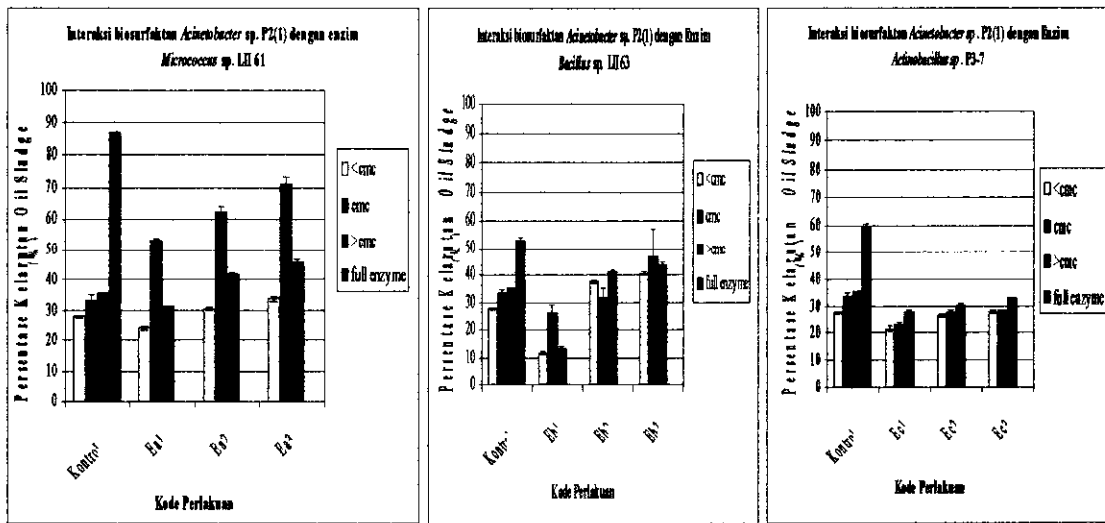
Biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Acinetobacter* sp. P(2)1 dan *Bacillus subtilis* 3KP pada substrat molase tergolong dalam kelompok *bioemulsifier* (Fatimah *et al.*, 2009; Ni'matuzahroh *et al.*, 2010). Biosurfaktan bakteri *Acinetobacter* sp. P(2)1 dan *Bacillus subtilis* 3KP dapat menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur dan memiliki kemampuan mengemulsi hidrokarbon uji. Penurunan tegangan permukaan supernatan kedua kultur bakteri uji sebesar  $>10$  dyne/cm menunjukkan bahwa bakteri tersebut berpotensi menghasilkan biosurfaktan (Francy *et al.*, 1991). Dan, adanya persentase emulsifikasi pada hidrokarbon uji seperti pada solar dan kerosen pada supernatan kultur membuktikan keberadaan emulsifier dalam kultur bakteri uji. Kestabilan emulsifikasi yang terbentuk dan perbedaan nilai CMC (*Critical Micelle Concentration*) juga merupakan indikasi kekuatan biosurfaktan. Nilai CMC suatu surfaktan tergantung pada struktur dari surfaktan tersebut, seperti halnya pH, kekuatan ionik, suhu dari larutan (*solution*), dan polaritas pelarut (*solvent*) yang digunakan untuk melarutkan surfaktan (Soberón-Chávez, 2010).

Potensi tiga bakteri dalam menghasilkan enzim dievaluasi dari pengukuran secara spektrofotometri nilai aktivitas enzim dengan fungsi waktu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Micrococcus* sp. LII 61 mempunyai nilai aktivitas lipolitik yang paling besar dibandingkan bakteri *Bacillus* sp. LII63B dan *Actinobacillus* sp. P3-7. Disamping itu, bakteri *Micrococcus* sp LII 61 dan *Bacillus* sp LII 63B juga dideteksi menghasilkan biosurfaktan dalam kultur produksi enzim lipase. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai aktivitas emulsifikasi supernatan *Micrococcus* sp. L II 61 pada minyak uji solar dan adanya penurunan tegangan permukaan supernatan kultur.

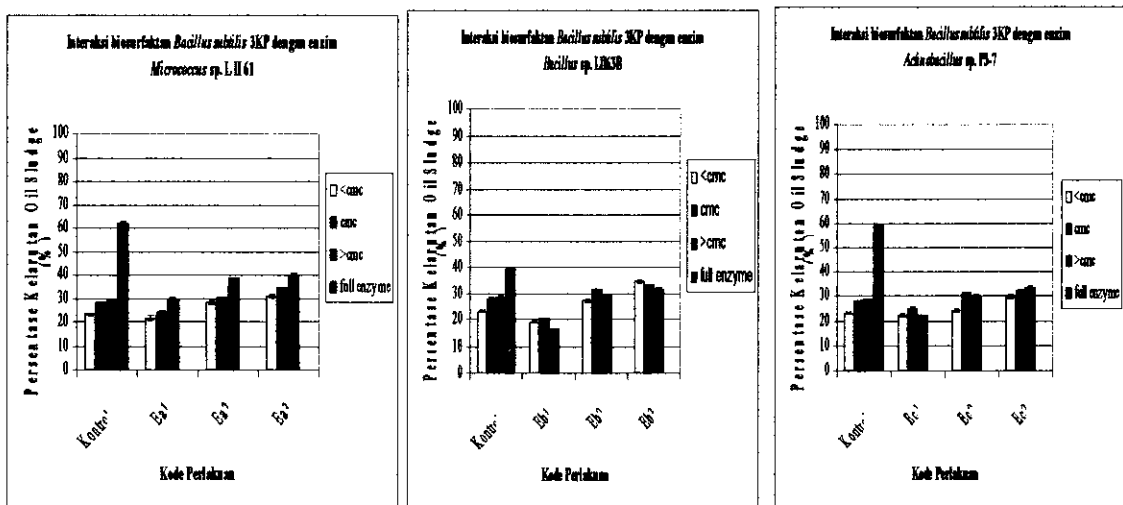
Hasil uji kelarutan *oil sludge* dengan variasi jenis biosurfaktan, jenis enzim, variasi konsentrasi biosurfaktan dan variasi konsentrasi enzim yang dicampurkan dalam kultur uji pada penelitian ini menunjukkan hasil yang beragam. Interaksi biosurfaktan dan enzim ada yang meningkatkan dan menurunkan persentase kelarutan *oil sludge* dibandingkan dengan biosurfaktan saja. Gabungan gambar hasil pengamatan kelarutan *oil sludge* dengan berbagai variasi perlakuan disajikan pada Gambar 5.10. dan Gambar 5.11. Biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P3-7 dapat ditingkatkan kemampuannya dalam melarutkan *oil sludge* dengan penambahan enzim *Micrococcus* sp LII 61 dan *Bacillus*



sp LII 63B. Sedangkan penambahan enzim *Actinobacillus* sp. P3-7 tidak memberikan pengaruh terhadap kelarutan *oil sludge* bahkan cenderung menghambat.



Gambar 5.10. Interaksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)-1 dengan enzim *Micrococcus* sp. LII61 (a); *Bacillus* sp., LII 63B (b) dan *Actinobacillus* sp., P3-7



Gambar 5.11. Interaksi biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dengan enzim *Micrococcus* sp. LII61 (a); *Bacillus* sp., LII 63B (b) dan *Actinobacillus* sp., P3-7

Interaksi antara biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP dengan enzim *Micrococcus* sp LII 61 dan *Bacillus* sp LII 63B dan *Actinobacillus* sp. P3-7 cenderung bersifat semakin meningkatkan kelarutan *oil sludge*. Konsentrasi biosurfaktan yang diujikan mempengaruhi kelarutan *oil sludge*. Konsentrasi = CMC dan >CMC cenderung tidak memberikan perbedaan yang berarti, tetapi berbeda dengan konsentrasi < CMC. Konsentrasi CMC sering dijadikan patokan uji dalam berbagai penelitian terkait dengan potensi biosurfaktan.



Penambahan konsentrasi enzim juga memberikan dampak yang berbeda terhadap kelarutan *oil sludge*. Pada penelitian ini, perlakuan penambahan enzim 12.5% cenderung belum memberikan pengaruh dalam peningkatan kelarutan *oil sludge*. Konsentrasi 25% (v/v) dan 37,5% (v/v). menunjukkan pengaruh dalam peningkatan kelarutan *oil sludge* dibandingkan dengan penambahan 12,5% (v/v).

Enzim *Micrococcus* sp LII 61 menunjukkan paling berpotensi dalam melarutkan *oil sludge*. Peningkatan konsentrasi enzim *Micrococcus* sp LII 61 dalam tabung uji terbukti dapat semakin meningkatkan kelarutan *oil sludge*. Interaksi yang ditunjukkan oleh enzim *Micrococcus* sp LII 61 bersifat positif baik terhadap biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 maupun dengan biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP.

Persentase kelarutan *oil sludge* paling tinggi ditunjukkan oleh interaksi antara biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 (= CMC) dengan enzim *Micrococcus* sp LII 61 (37,5%). Respon interaksi positif seperti ini juga dibuktikan dalam penelitian yang dilakukan oleh Takeyama *et al.* (2002) yaitu pada penggabungan supernatan dari kultur cair *Bacillus subtilis* IAM1213 penghasil biosurfaktan dengan supernatan dari kultur cair *Aeromonas* sp. NKB26c penghasil enzim (seperti lipase atau protease) sebagai *biocleaner*. Kombinasi tersebut menghasilkan efisiensi *cleaning* yang lebih tinggi dalam membersihkan *crude oil* dari ubin keramik bangunan pabrik, jika dibandingkan dengan penggunaan tunggal dari supernatan *Bacillus subtilis* IAM1213 ataupun *Aeromonas* sp. NKB26c saja. Penelitian tersebut menggambarkan bahwa kombinasi dari biosurfaktan dan enzim (seperti lipase ataupun protease) tersebut mungkin dapat meningkatkan aktivitas *cleaning*. Molekul hidrofilik dan hidrofobik dari biosurfaktan akan menyebabkan minyak serta protein larut dalam air. Dan enzim lipase akan mendegradasi minyak yang tidak larut dalam air menjadi produk yang larut dalam air.

Efek penghambatan terhadap kelarutan *oil sludge* juga terjadi dalam interaksi antara biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 dengan enzim *Actinobacillus* sp. P3-7. Hal tersebut diasumsikan terjadi interaksi negatif antara biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 dengan *crude enzyme* lipase *Actinobacillus* sp. P3-7. Respon interaksi negatif seperti ini juga ditemukan dalam penelitian yang dilakukan oleh Takeyama *et al.* (2002), yaitu pada pengkombinasian supernatan *B. subtilis* IAM1213 (penghasil biosurfaktan) dengan *B. cereus* NKB46b (penghasil enzim). Kondisi ini diduga disebabkan oleh adanya penghambatan aktivitas enzimatis lipase oleh biosurfaktan. Biosurfaktan adalah hasil ekskresi mikroorganisme yang memiliki sifat mirip dengan surfaktan (Thavasi *et al.*, 2009). Kehadiran surfaktan dalam media reaksi katalisis enzim lipase dapat mempengaruhi tingkat hidrolisis,





hal tersebut berkaitan dengan pembentukan kompleks enzim-surfaktan, sifat katalitiknya dapat berbeda dengan enzim aslinya.

Kombinasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 (= CMC) dengan enzim *Micrococcus* sp LII 61 (37,5% v/v) menghasilkan kelarutan *oil sludge* sebesar 71%. Capaian tersebut lebih besar dibanding dengan surfaktan sintetik Tween yang menghasilkan kelarutan 31,7%. Dengan demikian, formulasi tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen pelarut minyak.

## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

1. Jenis biosurfaktan (*Acinetobacter* sp. P(2) 1 dan *Bacillus subtilis* 3KP) dan jenis enzim (*Micrococcus* sp.LII 61, *Bacillus* sp., LII 63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7) memberikan respon yang beragam dalam kelarutan *oil sludge*.
2. Perbedaan konsentrasi biosurfaktan (*Acinetobacter* sp. P(2) 1 dan *Bacillus subtilis* 3KP) dan konsentrasi enzim *Micrococcus* sp.LII 61, *Bacillus* sp., LII 63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7 memberikan respon yang beragam. Peningkatan konsentrasi biosurfaktan dan enzim dapat meningkatkan kelarutan *oil sludge*
3. Interaksi antara biosurfaktan (*Acinetobacter* sp. P(2) 1 dan *Bacillus subtilis* 3KP) dan enzim (*Micrococcus* sp.LII 61, *Bacillus* sp., LII 63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7) ada yang bersifat meningkatkan dan menghambat kelarutan *oil sludge*.
4. Kombinasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 (=CMC) dan enzim *Micrococcus* sp LII 61 (37,5% v/v) merupakan kombinasi terbaik dalam melarutkan *oil sludge* sebesar 71% .

### 5.2 Saran

1. Melakukan penelitian lebih lanjut terkait mekanisme interaksi antara biosurfaktan dan enzim dalam aktivitas kelarutan *oil sludge*.
2. Melakukan penelitian lanjut uji dalam skala yang lebih besar terhadap efektivitas formulasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P3-7 dan enzim *Micrococcus* sp LII dalam kelarutan *oil sludge*.
3. Mempertimbangkan aplikasi formulasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P3-7 dan enzim *Micrococcus* sp LII 61 dalam penanganan pencucian tangki perminyakan akibat endapan *oil sludge*.
4. Mengembangkan metode pemberian formulasi biosurfaktan dan enzim dalam penanganan limbah *oil sludge*.



hal tersebut berkaitan dengan pembentukan kompleks enzim-surfaktan, sifat katalitiknya dapat berbeda dengan enzim aslinya.

Kombinasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 (= CMC) dengan enzim *Micrococcus* sp LII 61 (37,5% v/v) menghasilkan kelarutan *oil sludge* sebesar 71%. Capaian tersebut lebih besar dibanding dengan surfaktan sintetik Tween yang menghasilkan kelarutan 31,7%. Dengan demikian, formulasi tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen pelarut minyak.

## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

1. Jenis biosurfaktan (*Acinetobacter* sp. P(2) 1 dan *Bacillus subtilis* 3KP) dan jenis enzim (*Micrococcus* sp.LII 61, *Bacillus* sp., LII 63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7) memberikan respon yang beragam dalam kelarutan *oil sludge*.
2. Perbedaan konsentrasi biosurfaktan (*Acinetobacter* sp. P(2) 1 dan *Bacillus subtilis* 3KP) dan konsentrasi enzim *Micrococcus* sp.LII 61, *Bacillus* sp., LII 63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7 memberikan respon yang beragam. Peningkatan konsentrasi biosurfaktan dan enzim dapat meningkatkan kelarutan *oil sludge*
3. Interaksi antara biosurfaktan (*Acinetobacter* sp. P(2) 1 dan *Bacillus subtilis* 3KP) dan enzim (*Micrococcus* sp.LII 61, *Bacillus* sp., LII 63B, dan *Actinobacillus* sp. P3-7) ada yang bersifat meningkatkan dan menghambat kelarutan *oil sludge*.
4. Kombinasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P(2)1 (=CMC) dan enzim *Micrococcus* sp LII 61 (37,5% v/v) merupakan kombinasi terbaik dalam melarutkan *oil sludge* sebesar 71% .

### 5.2 Saran

1. Melakukan penelitian lebih lanjut terkait mekanisme interaksi antara biosurfaktan dan enzim dalam aktivitas kelarutan *oil sludge*.
2. Melakukan penelitian lanjut uji dalam skala yang lebih besar terhadap efektivitas formulasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P3-7 dan enzim *Micrococcus* sp LII dalam kelarutan *oil sludge*.
3. Mempertimbangkan aplikasi formulasi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P3-7 dan enzim *Micrococcus* sp LII 61 dalam penanganan pencucian tangki perminyakan akibat endapan *oil sludge*.
4. Mengembangkan metode pemberian formulasi biosurfaktan dan enzim dalam penanganan limbah *oil sludge*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Asia, I.O., I.B. Enwani, dan I.O. Eguavo. 2006. Characterization and Treatment of Sludge from The Petroleum Industry. *African Journal of Biotechnology*. 5: 461-466
- Banat, I. M. dan I. Rancich, I. 2009. No man Entry Tank Cleaning and VOC Control Using Biotechnological Interventions. *Environmental Technologies for Refineries Program*. University of Ulster. Europe.
- Bordoloi, N.K. dan B.K. Konwar. 2008. Microbial Surfactant-Enhanced Mineral Oil Recovery Under Laboratory Conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 63: 73-82.
- Budihardjo, M.A. 2007. Studi Pengaruh *Bulking Agents* pada Proses Bioremediasi Lumpur Minyak. *Jurnal Purifikasi*. 8: 55-60.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, dan L.G. Mitchell. 1998. *Biologi*. Jilid I. Penerjemah Rahayu Lestari et al. Jakarta: Erlangga.
- Chahinian, H., G. Vanot, A. Ibrik, N. Rugani, L. Sarda, L.C. Comeau. 2000. Production of Extracellular Lipases by *Penicillium cyclopium* Purification and Characterization of Partial Acylglycerol Lipase. *J. Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 215-222.
- Desai, J.D. dan I.M. Banat. 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(1): 47-64.
- Fatimah dan Nurhariyati, T. 2011. Eksplorasi Bakteri Proteolitik dan Lipolitik dari Limbah Rumah Potong Hewan. *Laporan Penelitian Hibah Riset*. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Fiechter, A. 1992 Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application. *Trends in Biotechnology* 10, 208-217.
- Francy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.I., dan Word, C.H. 1991. Emulsification of Hydrocarbon by Subsurface Bacteria. *J. Ind. Microbiol*. Vol. 8. pp. 237-246.
- Hamme, V., J. Jonathan, S. Ajay, dan O. P. Ward. 2006. Physiological Aspects: part 1 in a Series of Papers Devoted to Surfactants in Microbiology and Biotechnology. *Biotechnol Adv*. 24: 604-620.
- Hartomo, A.J. dan Widiatmoko, M.C. 1993. *Emulsi dan Pangan Instant Ber-Lesitin*. Yogyakarta : Andi Offset.
- Hasan, F., A. A. Shah, dan A. Hameed. 2006. Industrial Application of Microbial Lipases. *J. Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235-251.
- Hasnunidah, N. dan Sumardi. 2009. *Isolasi Bacillus sp. Penghasil Lipase dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung*. Jurusan Biologi. FMIPA. Unila.
- Hiol, A., M.D. Jonzo, N. Rugani,, D. Druet, L. Sarda, L.C. Comeau. 2000. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from a Thermophilic *Rhizopus oryzae* Strain Isolated from Palm Fruit. *J. Enzyme Microb Technol.*, 26, 421-430.
- Hou, C.T. and Johnston, T.M. 1992. Screening of Lipase Activities with Culture from The Agricultural Research Culture Collection. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 69, 1088-1097.
- Jurado, E., V. Bravo, G. Luzo'n, M. Ferna'ndez-Serrano, M. Garcí'a-Roma'n, D. Altmajer-Vaz, J. Mari'a Vicaria. 2007. Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme-Surfactant Interactions and Washing Tests. *J Surfact Deterg*. 10:61-70.
- Lasari, D. P. 2010. Bakteri Pengolah Limbah Minyak Bumi yang Ramah Lingkungan. (<http://www.esdm.go.id>). Diakses tanggal 12 Januari 2011.
- Miller, F.P., A.F. Vandome, dan J. McBrewster. 2010. *Lipase*. Alphascript Publishing. USA.
- Ni'matuzahroh, T. Surtiningsih, dan Isnaeni. 2003. Kemampuan Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Lingkungan Tercemar Minyak dalam Memproduksi Biosurfaktan : Upaya



- Bioremediasi Lingkungan. *Laporan Penelitian RUT VIII.3*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ni'matuzahroh, Fatimah, Agus Supriyanto, Moch. Affandi. 2009. Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Menggunakan Konsorsium Mikroba. *Lembaga Penelitian Universitas Airlangga*, Surabaya, Indonesia.
- Ni'matuzahroh, Fatimah, Tri Nurhariyati, 2010. Kinetika Produksi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP pada molase. Laporan Penelitian Fundamental. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Oxtoby, Gillis, dan Nachtrieb. 2003. *Prinsip-prinsip Kimia Modern*. Edisi Keempat. Penerjemah Suminar. Erlangga. Jakarta.
- Patin, S. 1999. *Environmental Impact Offshore Oil and Gas Industry*. Eco Monitor Publishing. USA.
- Pruthi, V., dan S.S Cameotra. 1997. Rapid Identification of Biosurfactant Producing Bacterial Strain Using a Cell Surface Hydrophobicity Techniques. *Biotechnol Technique*. 11 (9): 671-674.
- Qin, S.Y., Z.X. Chen, F. Ma, S.H. Guo, Y.F. Niu, dan F. M. Li. 2005. Bio-Surfactant Preparation for Oily Sludge Treatment. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Science and Technology*. Rhodes Island, Greece, 1-3 September 2005.
- Reetz, M.T., J.D. Carballeira, A. Vogel. 2006. Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 7745-7751.
- Rodrigues, L., I. M. Banat, J. Teixeira dan R. Oliveira. 2006. Biosurfactants: Potential Applications in Medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1-10.
- Ron, E.Z. dan E. Rosenberg. 2001. Natural Roles of Biosurfactants. *Environ. Microbiol.* Vol. 3 No. 4, pp. 229-236.
- Rossiana, N., T. Supriatun, dan Y. Dhahiyat. 2007. Fitoremediasi Limbah Cair dengan Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms) dan Limbah Padat Industri Minyak Bumi dengan Sengon (*Paraserianthes falcataria* L. Nielsen) Bermikoriza. *Laporan Penelitian*. Universitas Padjajaran.
- Rouse, J.D., D.A. Sabatini, J.M. Sufliata, dan J.H. Harwell, 1994. Influence of Surfactants on Microbial Degradation of Organic Compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 24(4): 325-370.
- Setyowati, C. H., B. Zaman, dan Syafrudin. 2003. Studi Penurunan Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) pada Oil Sludge dengan Composting Bioremediation. *Project Report. Environment Engineering*. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sharma, R., Y. Chisti, dan U.C. Banerjee. 2001. Production, Purification, Characterization, and Application of Lipase. *J. Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Shofinita, D. 2009. Atasi Limbah Oil Sludge dengan Teknologi Plasma. (<http://www.majarimagazine.com>). Diakses pada tanggal 14 Januari 2011.
- Sihotang, H. dan M. Ginting. 2006. Pembuatan Monogliserida melalui Gliserolisis Minyak Inti Sawit menggunakan Katalis Natrium Metoksida. *J. Sains Kimia.*, 10, 51-57.
- Soberón-Chávez, Gloria. 2010 Biosurfactants: From Genes to Applications. *Springer Microbiology Monographs* 20, 2-4.
- Sugiarto, A.T. 2004. Teknologi Plasma untuk Daur Ulang Limbah Oil Sludge (<http://www.beritaiptek.com>). Diakses pada tanggal 29 September 2010.
- Sumarsih, S. 2002. Uji Aktivitas Lipolitik Beberapa Bakteri Hidrokarbonoklastik Hasil Isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak dan Produksi Lipase dari Strain Terpilih. *Laporan Penelitian Dosen Muda*. FMIPA. Universitas Airlangga. Surabaya.





- Takeyama, H., M. Wada, and T. Matsunaga. 2002. Screening of Soil Bacteria for Production of Biocleaner. *J. Applied Biochemistry and Biotechnology* 2, 98-100.
- Tabatabaee, A., M. Mazaheri Assadi, A. A. Noohi dan V. A. Sajadian. 2005. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian J Env Health Sci Eng.* 2(1): 6-12.
- Thavasi R, M.S. Nambaru , S. Jayalakhsmi, T. Balasubramanian, and I.M. Banat. 2009. Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. *Mar Biotechnol* 11, 551-556.
- Ulum, B. 2004. Pengaruh Konsentrasi Molase dan Natrium Nitrat terhadap Produksi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP. *Skripsi*. FMIPA Universitas Airlangga, Surabaya.
- Vater, J., B. Kablitz, C. Wilde, P. Franke, N. Mehta, dan S.S. Cameotra. 2002. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 Isolated from Petroleum Sludge. *Appl Environ Microbiol.* 68: 6210-6219.
- Vincent, M. Microbial Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Oily Sludge Wastes. *J. Microbiol.*
- Widodo. 2010. Uji Efektivitas Biosurfaktan dari *Acinetobacter sp.* P2(1) dan *Pseudomonas putida* T1(8) dalam Memobilisasi Minyak Mentah Menggunakan *Sand Pack Column*. *Skripsi*. FST Universitas Airlangga Surabaya.
- Yuliani, H., 2004. Isolasi dan Karakterisasi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3Kp pada Substrat Molase. *Skripsi*, Universitas Airlangga, Surabaya.
