

Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012



Karakterisasi Produk dan Deteksi Gen Penyandi Biosurfaktan Bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) : Upaya Over Produksi Biosurfaktan Untuk Aplikasi Industri

Fatimah, S.Si., M.Kes.
Dr. Afaf Baktir, M.S.
Ahmad Thontowi, S.Si., M.Si

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

Universitas Airlangga
2012

Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012



Karakterisasi Produk dan Deteksi Gen Penyandi Biosurfaktan Bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) : Upaya Over Produksi Biosurfaktan Untuk Aplikasi Industri

**Fatimah, S.Si., M.Kes.
Dr. Afaf Baktir, M.S.
Ahmad Thontowi, S.Si., M.Si**

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

**Universitas Airlangga
2012**

HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL : Karakterisasi Produk dan Deteksi Gen Penyandi Biosurfaktan Bakteri *Acinetobacter* sp.(P2)1: Upaya Over Produksi Biosurfaktan Untuk Aplikasi Industri
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : Fatimah, S.Si.,M.Kes
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 19741015 200212 2 001/ III c
 - d. Pangkat/Golongan : Penata /IIIc
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor
 - f. Bidang Keahlian : Mikrobiologi
 - g. Fakultas / Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi / UNAIR
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Dr. Afaf Baktir, M.S., Apt.	Biokimia/Bioteknologi	Sains dan Teknologi	Unair
2.	Ahmad Thontowi, S.Si., M.Si.	Bioteknologi	LIPI	Bogor


3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp. 150.000.000 (3 th)
- c. Biaya yang disetujui tahun ini : Rp. 35.000.000

Surabaya, 31 Oktober 2012

Ketua Peneliti

Mengetahui
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

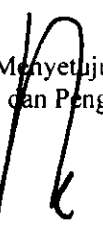



Prof. Wih Dardanto, M.Si, PhD
NIP. 19610816 198701 1 001



Fatimah, S.Si., M.Kes
NIP. 19741015 200212 2 001

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

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

RINGKASAN

Permintaan terhadap surfaktan baru yang spesifik pada bidang pertanian, kosmetik, makanan, industri farmasi, dan lingkungan terus meningkat. Semenjak adanya kebijakan bahwa surfaktan yang digunakan harus efektif dan sesuai dengan lingkungan, maka para peneliti tertarik untuk menemukan surfaktan yang dihasilkan oleh mikroba (Banat *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2006 dalam Shoberon-Chaves and Maier, 2011).

Surfaktan yang dihasilkan oleh mikroba atau disebut biosurfaktan adalah molekul aktif permukaan. Senyawa aktif permukaan yang dihasilkan mikroba memiliki kemampuan menurunkan tegangan permukaan dan antar muka di antara dua fase cairan. Biosurfaktan, ditemukan di alam dalam berbagai macam struktur kimia (Muthusamy *et al.*, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk 1) mengetahui konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi yang optimum untuk produksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1), 2) mengetahui karakteristik biosurfaktan yang diproduksi oleh *Acinetobacter* sp. P2(1) dalam substrat glukosa dan mengetahui nama jenis bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) berdasarkan sekuen 16S rDNA.

Penelitian menunjukkan bahwa 1) konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi optimum untuk produksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) adalah glukosa 3% dengan inkubasi 4 hari dengan penurunan nilai tegangan permukaan supernatan sebesar 19,65 mN/m, aktivitas emulsi sebesar 63,20 % pada solar dan 61,22% pada kerosin. 2) karakteristik biosurfaktan yang dihasilkan *Acinetobacter* sp. P2(1) adalah memiliki nilai CMC sebesar 9,99 g/L, stabil pada pH 2-12, stabil pada suhu 20-50° C. 3) biosurfaktan yang diproduksi tersusun atas komponen karbohidrat, fosfat, dan asam lemak (asam palmitat dan stearat merupakan komponen terbesar, masing-masing 29,79% dan 23,49%.

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi yang optimum untuk produksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1), karakteristik biosurfaktan yang diproduksi oleh *Acinetobacter* sp. P2(1), dan untuk mengidentifikasi bakteri *Acinetobacter* berdasarkan sekuen 16SrDNA. Media produksi biosurfaktan berupa medium garam minimal dengan kandungan glukosa 1, 2, dan 3% serta diinkubasi dalam 1, 2, 3, dan 4 hari. Dua persen suspensi bakteri diinokulasikan pada masing-masing media dan diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 30°C. Biosurfaktan yang dihasilkan diekstraksi menggunakan metode presipitasi dengan ammonium sulfat 60%. Karakteristik produk kasar yang diukur adalah nilai tegangan permukaan, aktivitas emulsi, nilai Critical Micelle Concentration (CMC), stabilitas biosurfaktan terhadap perubahan pH dan suhu dilakukan analisis komponen kimia secara kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi terbaik dicapai pada kultur dengan konsentrasi glukosa 3% dan waktu inkubasi 4 hari, mampu menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur sebesar 19,65 mN/m dengan aktivitas emulsi pada solar sebesar 63,12% dan 61,22% pada kerosin. Produk kasar biosurfaktan diperoleh sebesar 41,16 g/L dengan nilai CMC 9,99 g/L, stabil pada kisaran suhu 20-50°C dan pH 2-12. Produk kasar mengandung komponen kimia berupa karbohidrat, fosfat, dan 8 macam asam lemak, dengan asam palmitat (29,79%) dan asam stearat (23,49%) yang paling dominan.

Kata kunci: *Acinetobacter* sp. P2(1), aktivitas emulsi, tegangan permukaan, karakteristik biosurfaktan

ABSTRACT

This research was aimed to know the best combination of glucose concentration on medium and incubation time for biosurfactant production of Acinetobacter sp. P2(1), characteristics of Acinetobacter sp. P2(1) biosurfactant, and identified this bacteria based on 16SrDNA sequence. Growth medium consist of minimal salt medium with the addition of glucose in various concentration (1%, 2%, dan 3%). Two percent (v/v) culture of Acinetobacter sp. P2(1) was inoculated into the medium (OD=0,5 at λ =650 nm) and was incubated on a shaker at 30°C and 120 rpm. The biosurfactant production was observed at the different incubation period (1, 2, 3, and 4 days). The data were surface tension value, emulsification activity, CMC value, stability of activities at range of temperature and pH, and chemical component of biosurfactant. The results of this research showed that ammonium sulphate 60% could precipitated biosurfactant with result product in the amount of 41,16 g/L. The crude biosurfactant could reduced the surface tension of culture supernatant until 19,65 mN/m, had an emulsion activity on diesel fuel up to 63, 12 mN/m and kerosene up to 61,22 mN/m, CMC value 9.99 g/L, stable in pH range 2-12 and in temperature 20-50°C. Biosurfactant of Acinetobacter sp P2(1) contain of carbohydrate, phosphate and fatty acid component i.e. palmitic acid (29,79%) and stearic acid (23,49%) were dominant.

Keywords: *Acinetobacter sp. P2(1), emulsification activity, surface tension, biosurfactant characteristics.*

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Alloh SWT atas segala limpahan karunia dan rahmatNya sehingga Penulis diberi kekuatan untuk melaksanakan penelitian dan menyusun draft laporan. Laporan ini merupakan hasil penelitian Unggulan Perguruan Tinggi yang berjudul Karakterisasi Produk dan Deteksi Gen Penyandi Biosurfaktan Bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1): Upaya Over Produksi Biosurfaktan Untuk Aplikasi Industri.

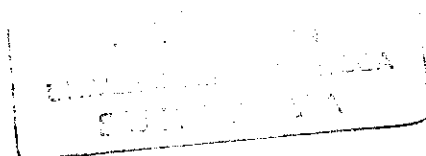
Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian laporan ini. Penulisan laporan ini masih jauh dari sempurna, untuk itu saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaannya.

Surabaya, 31 Oktober 2012

Tim Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
ABSTRAK	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Tinjauan tentang Biosurfaktan	6
2.2. Biosintesis Biosurfaktan	7
2.3. Regulasi Sintesis Biosurfaktan	10
2.4. Klasifikasi dan Mikroba Penghasil Biosurfaktan	15
2.5. Aplikasi Biosurfaktan	18
2.6. Karakteristik Biosurfaktan	21
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	28
3.1. Tujuan Penelitian	28
3.2. Manfaat Penelitian	29



BAB IV. METODE PENELITIAN.....	30
4.1. Biosintesis Biosurfaktan oleh <i>Acinetobacter</i> sp. P(2)1	30
4.2. Ekstraksi Biosurfaktan <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1).....	31
4.3. Karakterisasi Supernatan dan Produk Biosurfaktan.	32
4.4. Analisis Kualitatif Komponen Kimia	34
4.5. Identifikasi Bakteri Berdasarkan Sekuen 16S rDNA	35
4.6. Pemurnian Ekstrak Kasar Biosurfaktan.....	42
4.7. Identifikasi Gen Penyandi Produksi Biosurfaktan.....	43
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
5.1. Respon Pertumbuhan <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1).....	45
5.2. Produksi Biosurfaktan <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) Pada Berbagai Konsentrasi	
Glukosa	48
5.3. Perolehan Ekstrak Kasar Biosurfaktan <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1).....	51
5.4. Karakteristik Ekstrak Kasar biosurfaktan <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1).....	52
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	59
DAFTAR PUSTAKA.....	60
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba	16
Tabel 2. Polimer Biosurfaktan yang dihasilkan oleh spesies anggota Genus <i>Acinetobacter</i>	27
Tabel 3. Larutan untuk reaksi PCR 16S rDNA bakteri <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1).....	38
Tabel 4. Komposisi 2X PCR <i>master mix</i>	38
Tabel 5. Program reaksi PCR untuk amplifikasi 16S rDNA <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1).....	39
Tabel 6. Larutan yang digunakan untuk reaksi PCR sekuensing 16S rDNA.....	41
Tabel 7. Primer yang digunakan untuk reaksi PCR sekuensing 16S rDNA	42
Tabel 8. Program reaksi PCR untuk sekuensing 16S rDNA bakteri <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1)	42
Tabel 9. Primer yang digunakan dalam penelitian	44
Tabel 10. Rata-rata penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) dalam substrat glukosa 1%	49
Tabel 11. Rata-rata penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) dalam substrat glukosa 2%	49
Tabel 12. Rata-rata penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) dalam substrat glukosa 3%	49
Tabel 13. Aktivitas emulsifikasi (AE) supernatan kultur <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) menggunakan glukosa 1%.....	50
Tabel 14. Aktivitas emulsifikasi (AE) supernatan kultur <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) menggunakan glukosa 2%.....	51
Tabel 15. Aktivitas emulsifikasi (AE) supernatan kultur <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) menggunakan glukosa 3%	51
Tabel 16. Pengaruh penambahan konsentrasi produk kasar biosurfaktan <i>Acinetobacter</i> sp. P2(1) terhadap nilai tegangan permukaan.....	53
Tabel 17. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan suhu (1 jam)	54

Tabel 18. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan suhu (24 jam)	54
Tabel 19. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan pH (1 jam).....	55
Tabel 20. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan pH (24 Jam).....	55
Tabel 21. Pengukuran nilai tegangan permukaan larutan buffer pH	56
Tabel 22. Pengukuran nilai tegangan permukaan larutan setelah penambahan biosurfaktan	56
Tabel 23. Hasil pengamatan uji kualitatif komponen kimia ekstrak kasar biosurfaktan.....	57

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1.** Struktur emulsan *Acinetobacter lwoffii* RAG-1
- Gambar 2.** Jalur biosintesis biosurfaktan
- Gambar 3.** Organisasi genetik kelompok gen *wee* yang bertanggung jawab terhadap produksi emulsan
- Gambar 4.** Jalur biosintesis emulsan
- Gambar 5.** Kurva pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada berbagai konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi (metode OD)
- Gambar 6.** Kurva pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada berbagai konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi (metode TPC)
- Gambar 7.** Grafik rata-rata nilai pH kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) selama pertumbuhan pada berbagai konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi
- Gambar 8.** Aktivitas emulsi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada solar dengan substrat glukosa 3% dengan waktu inkubasi 4 Hari

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1. Latar Belakang**

Permintaan terhadap surfaktan baru yang spesifik pada bidang pertanian, kosmetik, makanan, industri farmasi, dan lingkungan terus meningkat. Semenjak adanya kebijakan bahwa surfaktan yang digunakan harus efektif dan sesuai dengan lingkungan, maka para peneliti tertarik untuk menemukan surfaktan yang dihasilkan oleh mikroba (Banat *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2006 dalam Shoberon-Chaves and Maier, 2011).

Surfaktan yang dihasilkan oleh mikroba atau disebut biosurfaktan adalah molekul aktif permukaan. Senyawa aktif permukaan yang dihasilkan mikroba memiliki kemampuan menurunkan tegangan permukaan dan antar muka di antara dua fase cairan. Biosurfaktan, ditemukan di alam dalam berbagai macam struktur kimia (Muthusamy *et al.*, 2008), meliputi glikolipida, lipopeptida dan lipoprotein, asam lemak, lipida netral, fosfolipida, lipida polimerik dan partikulat. Biosurfaktan berbeda dari surfaktan sintetis dalam hal tidak beracun, lebih efektif dan ramah lingkungan. Biosurfaktan unggul secara komersial dibanding surfaktan kimia sintetis karena kestabilannya pada temperatur, pH, dan salinitas yang ekstrim. Sifat ini dibutuhkan pada berbagai proses industri seperti pengolahan makanan, formulasi farmasi, pengilangan minyak dan bioremediasi lingkungan (Desai and Banat, 1997 dalam Das *et al.*, 2008; Jacobucci *et al.*, 2009). Terlepas dari aplikasi biosurfaktan selama ini, biosurfaktan juga dilaporkan memiliki sifat antibakteri, antijamur, antitumor, antimikoplasma dan antivirus (Cameotra and Makkar, 2004; Singh and Cameotra, 2004 dalam Das *et al.*, 2008; Gunther *et al.*, 2005).

Biosurfaktan yang selama ini telah banyak dikaji secara detil adalah rhamnolipid yang diproduksi oleh *Pseudomonas aeruginosa* (Soberon-Chavez *et al.*, 2005 dalam Soberon-Chaves and Maier, 2011) dan beberapa spesies *Burkholderia* (Dubeau *et al.*, 2009 dalam Soberon-Chaves and Maier, 2011), dan surfaktin, sebuah lipopeptida yang disintesis oleh *Bacillus subtilis* (Mulligan, 2005 dalam Soberon-Chaves and Maier, 2011). Kedua biosurfaktan tersebut merupakan contoh biosurfaktan efektif yang dapat menurunkan tegangan permukaan antara air murni dan udara, dari 73 mN/m hingga kurang dari 30 mN/m.

Spesies *Acinetobacter* diketahui menghasilkan biosurfaktan dengan berat molekul tinggi yang dikenal dengan nama emulsan dan alasan. Mayoritas strain *Acinetobacter* termasuk isolat dari rumah sakit maupun dari lingkungan, memproduksi bioemulsan (Sar and Rosenberg, 1983 dalam Toren *et al.*, 2002). Studi terbaik mengenai bioemulsan adalah pada *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, *A. calcoaceticus* BD4, dan *Acinetobacter radioresistens* KA53 (Toren *et al.*, 2002).

Emulsan RAG-1 yang diproduksi oleh *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 merupakan kompleks lipoheteropolisakarida dan protein yang terikat oleh ikatan nonkovalen. Bagian polisakarida yang disebut sebagai apoemulsan terdiri dari berbagai komponen gula seperti D-galaktosamin, asam D-galaktosaminuronat dan diamino-dideoksi glukosamin. Asam lemak menyusun 12 % dari biopolimer ini dan membuatnya bersifat amfifatik. Sementara itu, emulsan BD4 yang diproduksi oleh *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 terdiri dari unit berulang heptasakarida L-rhamnosa, D-glukosa, D-asam glukuronat dan D-manosa dalam rasio molar 4:1:1:1. Nakar and Gutnick (2001) menyatakan bahwa biosintesis emulsan membutuhkan sekelompok gen berukuran 27 kb yang disebut gen *wee* (*wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx*, *wzy*). Sementara itu, alasan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter radioresistens* KA53

bersifat anionik, mempunyai berat molekul tinggi, merupakan kompleks polisakarida anionik yang mengandung alanin yang terikat secara kovalen dan tiga protein AlnA, AlnB, dan AlnC (Das *et al.*, 2008). Protein Aln A berukuran 45kDa memiliki aktivitas emulsifikasi dan dikode oleh gen *alnA* (Toren *et al.*, 2002).

Indonesia dengan keanekaragaman hayati yang sangat tinggi berpeluang besar untuk mengembangkan surfaktan yang diproduksi dari mikroba lokal. Penelitian kami sebelumnya (Ni'matuzahroh *et al.*, 2009) telah berhasil mengeksplorasi mikroba potensial pendegradasi minyak dari tanah tercemar minyak bumi pada lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo, Kecamatan Kedewan, Kabupaten Bojonegoro, Jawa Timur, serta depo Pertamina Tanjung Perak Surabaya. Tiga belas isolat bakteri dan tiga khamir potensial pendegradasi komponen hidrokarbon telah berhasil diisolasi. Fatimah *et al.* (2009) menguji kemampuan isolat-isolat tersebut dalam memproduksi biosurfaktan. Uji dilakukan dengan mengukur nilai tegangan permukaan supernatan kultur dan aktivitas emulsifikasi menggunakan berbagai hidrokarbon uji (kerosen, solar, minyak goreng, dan minyak mentah). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari sepuluh isolat yang diuji, *Pseudomonas putida* T1(8) dan *Acinetobacter* sp. P2(1) menunjukkan kemampuan yang paling baik. Selain itu, *Acinetobacter* sp. P2(1) telah diuji kemampuannya dalam menghasilkan biosurfaktan dengan ditumbuhkan pada beberapa substrat hidrokarbon (solar, pelumas, *crude oil*) maupun karbohidrat (molase, dan gula cair).

Hasil uji produksi biosurfaktan (Fatimah *et al.*, 2009) dan karakterisasi produk kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada substrat molase (Qur'aini, 2011) menunjukkan bahwa isolat tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai produser biosurfaktan. Biosurfaktan yang dihasilkan memiliki sifat sebagai bioemulsifier dan aktif permukaan. Sifat sebagai agen pengemulsi dan aktif

permukaan ini merupakan karakteristik utama biosurfaktan yang dapat digunakan dalam berbagai aplikasi industri dan teknologi perlindungan lingkungan (bioremediasi).

Di satu sisi, pengetahuan mengenai sintesis biosurfaktan secara molekular merupakan kajian yang sangat penting untuk diungkap. Hal tersebut sangat dibutuhkan dalam upaya peningkatan produksi biosurfaktan melalui isolasi gen yang bertanggung jawab terhadap sintesis molekul-molekul penyusun biosurfaktan (Chakrabarty, 1976; Lin, 1996; dan Summers, 1996 dalam Das *et al.*, 2008). Upaya memperoleh strain baru dengan kemampuan yang unggul serta didukung dengan teknologi produksi yang baik menjadi suatu hal yang penting untuk mengatasi kebergantungan pada penggunaan surfaktan sintetis.

Isolasi gen yang menyandi biosurfaktan merupakan salah satu langkah awal produksi biosurfaktan dalam skala besar melalui rekayasa genetika. White *et al.* (1990 dalam Putranto *et al.*, 2006) mengemukakan bahwa *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode deteksi yang tergolong mudah untuk mengetahui keberadaan gen target di dalam organisme uji. Pasangan primer heterologous yang dirancang berdasarkan daerah terkonservasi pada gen target dapat digunakan dalam PCR tersebut. Selain itu, kajian terkait gen penyandi produksi biosurfaktan dan upaya mengungkap potensi isolat lokal Indonesia belum banyak dilakukan, sehingga penelitian ini sangat penting untuk dilakukan agar pemenuhan kebutuhan biosurfaktan dalam negeri dapat diatasi.

Pada penelitian ini dilakukan tiga tahapan penelitian, yaitu 1) tahun pertama, karakterisasi produk biosurfaktan dalam substrat glukosa dan identifikasi bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) berdasarkan sekuen 16S rDNA. Identifikasi sebelumnya menggunakan sistem klasifikasi fenetik dengan mengamati karakter morfologi dan

sebagian kecil karakter fisiologi 2) tahun kedua, penelitian diarahkan untuk mengetahui jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter* sp. P2(1) dan 3) tahun ketiga, penelitian dilakukan untuk mengetahui gen penyandi biosurfaktan pada *Acinetobacter* sp. P2(1).

1.2. Rumusan Masalah

Tahun pertama

1. Berapakah konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi yang optimum untuk produksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1)?
2. Bagaimanakah karakteristik biosurfaktan yang diproduksi oleh *Acinetobacter* sp. P2(1)?
3. Apakah nama strain bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) berdasarkan sekuen 16S rDNA?

Tahun kedua

4. Apakah jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter* sp. P2(1)?

Tahun ketiga

5. Gen apakah yang menyandi produksi biosurfaktan pada *Acinetobacter* sp. P2(1)?

BAB II

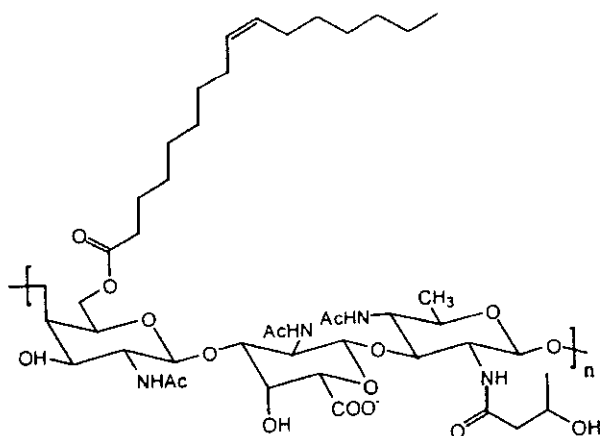
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Biosurfaktan

Biosurfaktan adalah surfaktan yang dihasilkan oleh mikroba, mengandung komponen aktif permukaan (Van Dyke, 1993; Desai and Banat, 1997) yang bersifat amfifatik, yaitu terdiri dari komponen hidrofilik dan hidrofobik. Sifat amfifatik memungkinkan molekul-molekul biosurfaktan berada pada bagian antar permukaan (interfase: cair-gas, cair-cair, cair-padat) dan mempunyai kemampuan menurunkan tegangan permukaan media cair (bersifat tensioaktif) (Bertrand *et al.*, 1997). Bagian hidrofilik (kepala biosurfaktan) bersifat polar dan merupakan derivat dari ester, karbohidrat, asam amino, peptida siklis, fosfat, golongan alkohol fungsional dari lemak netral, atau asam karboksilat yang berfungsi mengikat molekul air. Bagian hidrofobik (ekor) bersifat non polar, dan umumnya berupa rantai hidrokarbon dari asam lemak, hidroksi asam lemak, atau α -alkil- β -hidroksi asam lemak yang berfungsi untuk mengikat molekul minyak (Desai and Desai, 1993). Biosurfaktan mempunyai kelebihan khusus bila dibandingkan dengan surfaktan sintetik karena memiliki tingkat toksisitas yang relatif rendah, mudah terurai secara alamiah, stabil terhadap perubahan temperatur, pH, dan kadar garam yang ekstrim (Desai and Desai, 1993 *dalam* Kosaric, 1993).

Pada umumnya, biosurfaktan memiliki gugus hidrofobik yang dapat berupa asam lemak rantai panjang, hidroksi asam lemak, atau α -alkil- β -hidroksi asam lemak dan gugus hidrofilik dapat berupa karbohidrat, asam amino, siklopeptida, fosfat, asam karboksilat, alkohol, dan lain-lain. Kelompok biosurfaktan terdiri dari: (1) glikolipid, (2) fosfolipid dan asam lemak, (3) lipopeptida dan protein, (4) surfaktan polimer, dan (5) biosurfaktan partikulat (Desai dan Desai, 1993).

Sifat fisika dan kimia, kemampuan menurunkan tegangan permukaan, dan stabilitas emulsi yang dimiliki biosurfaktan sangat penting dalam pencarian biosurfaktan potensial (Desai and Desai, 1993 dalam Kosaric, 1993). Menurut Gerson (1993 dalam Kosaric 1993) sebagian besar biosurfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan sebesar 25 ± 5 mN/m dari nilai tegangan permukaan akuades sebesar 72 mN/m pada suhu ruang, bergantung pada konsentrasi dan tipe biosurfaktan tersebut. Gambar 1 di bawah ini adalah struktur Emulsan, yaitu biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. Sifat amfifatik emulsan disebabkan keberadaan asam lemak yang berikatan dengan rangka polisakarida yang terikat dengan ester dan amida (Blesky *et al.*, 1979 dalam Nakar and Gutnick, 2001).



Gambar 1. Struktur emulsan *Acinetobacter lwoffii* RAG-1

2.2. Biosintesis Biosurfaktan

Organisme menggunakan energi yang diperoleh melalui proses katabolisme untuk mensintesis komponen-komponen molekular yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan reproduksinya (Desai and Desai, 1993). Metabolisme mikroba merupakan suatu proses yang terintegrasi yang membutuhkan aktivitas beberapa enzim yang terkoordinasi. Biosurfaktan adalah metabolit mikroba dengan struktur

amfipatik, dimana bagian hidrofobiknya berupa asam lemak rantai panjang, asam lemak hidroksi, atau asam lemak α - alkil - β - hidroksi dan bagian hidrofilik dapat berupa karbohidrat, asam amino, peptida siklik, fosfat, asam karboksilat, atau alkohol. Jalur metabolik yang terlibat dalam sintesis 2 kelompok prekursor ini (bagian hidrofilik dan hidrofobik) adalah bermacam-macam dan menggunakan satu perangkat enzim yang spesifik. Dalam banyak hal, enzim spesifik untuk sintesis prekursor ini adalah enzim regulatori (Desai and Desai, 1993).

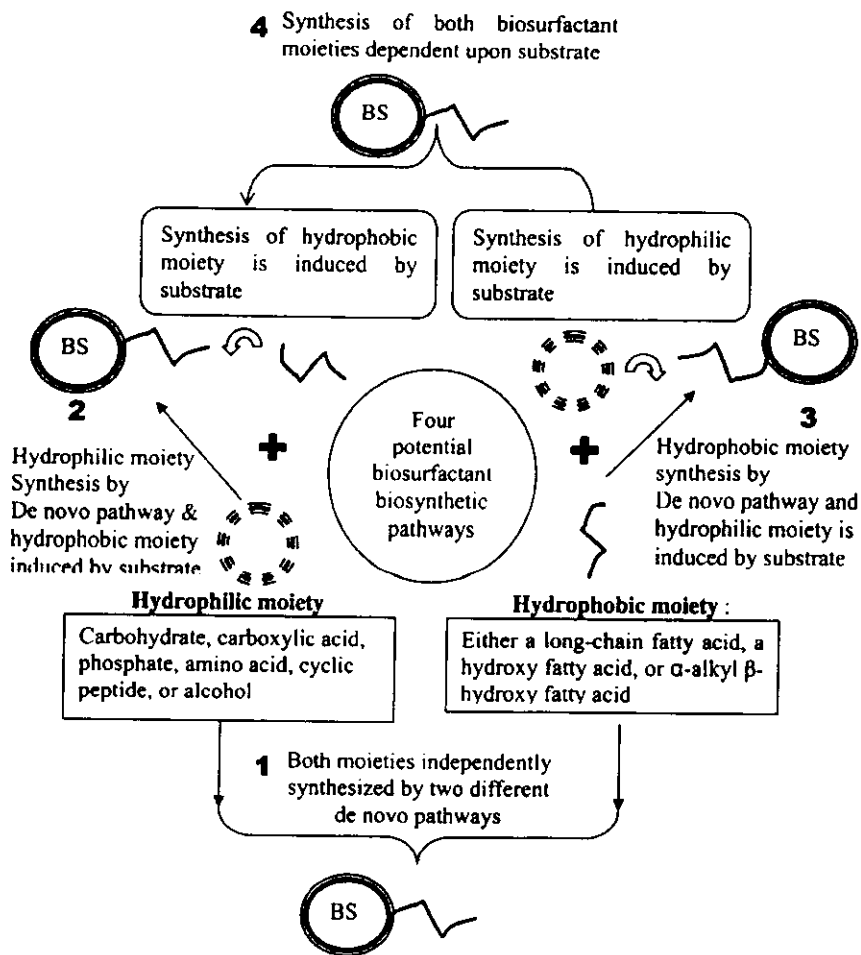
Menurut Syldatk and Wagner (1987 dalam Desai and Desai, 1993) terdapat 3 kemungkinan sintesis biosurfaktan :

1. Sintesis *de novo* bagian hidrofilik dan hidrofobik melalui 2 jalur yang tidak saling tergantung, kemudian diikuti dengan penggabungan kedua bagian tersebut dalam bentuk molekul biosurfaktan yang lengkap.
2. Sintesis *de novo* bagian hidrofilik dan sintesis bagian hidrofobik yang tergantung substrat dan penggabungan kedua bagian tersebut.
3. Sintesis *de novo* dari bagian hidrofobik dan sintesis bagian hidrofilik yang diikuti dengan penggabungan kedua bagian tersebut.

Sintesis bagian hidrofobik dan hidrofilik tergantung pada substrat yang digunakan. Wagner *et al.* (1985 dalam Desai and Desai, 1993) menunjukkan bahwa meskipun komposisi biosurfaktan yang diproduksi oleh *Pseudomonas sp.* dipengaruhi oleh substrat karbon dalam medium serta kondisi biakan, perbedaan panjang rantai hidrokarbon tidak memengaruhi panjang rantai asam lemak glikolipid yang dihasilkan. Sementara itu penelitian mengenai sintesis glikolipid pada isolat bakteri H-13A yang ditumbuhkan dalam substrat alkana, Finnerty and Singer (1985 dalam Desai and Desai, 1993) menunjukkan adanya variasi asam lemak baik secara

kuantitatif maupun kualitatif berhubungan dengan jumlah atom karbon dari substrat alkana yang digunakan.

Jalur sintesis bagian biosurfaktan oleh mikroba ditunjukkan dalam Gambar 2 (Sen, 2010). Enzim-enzim yang digunakan dalam jalur sintesis biosurfaktan dapat bersifat konstitutif atau induktif. Enzim konstitutif selalu terbentuk dalam sel tanpa mengenal substrat dan kondisi tumbuh sel, sedangkan enzim induktif terbentuk ketika sel ditumbuhkan pada substrat dan kondisi tertentu (Mukherjee and Palaspriya, 2006).



Gambar 2. Jalur biosintesis biosurfaktan

(keterangan: BS= molekul biosurfaktan. Jalur biosintesis yang mungkin terjadi pada berbagai mikroorganisme) Sumber: Syldatk and Wagner (1987 dalam Sen, 2010)

2.3. Regulasi Sintesis Biosurfaktan

Terdapat 3 fenomena utama yang mengatur produksi biosurfaktan yang berlebihan yaitu : (1) induksi, (2) represi dan (3) efek yang diperantarai nitrogen dan kation multivalensi.

1. Regulasi sintesis biosurfaktan melalui induksi

Umumnya, mikroba memproduksi biosurfaktan ketika ditumbuhkan pada substrat yang tidak larut (Desai and Desai, 1993). Chakrabarty (1985 dalam Desai and Desai, 1993) melaporkan adanya produksi glikolipid EM oleh *Pseudomonas aeruginosa* SB-30 ketika ditumbuhkan pada alkana. Mutan yang tidak mampu memproduksi biosurfaktan, gagal menggunakan substrat alkana, namun pertumbuhannya dapat dikembalikan dengan penambahan biosurfaktan ke dalam medium pertumbuhannya. Hisatsuka (1972 dalam Desai and Desai, 1993) melaporkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* ketika ditumbuhkan pada substrat n-alkana, mensekresikan bahan aktif permukaan dalam medium, namun bahan ini tidak terdeteksi selama pertumbuhannya pada substrat karbohidrat. Neufeld *et al.*, (1983 dalam Desai and Desai, 1993) mengamati adanya penurunan tegangan permukaan dan antar permukaan kultur cair selama pertumbuhan *Arthrobacter calcoaceticus* pada substrat hidrokarbon.

Penggunaan actidion sebagai suatu inhibitor dapat menginduksi *Endomycopsis lipolytica* untuk memproduksi faktor pseudosolubilisasi (Roy *et al.*, 1979). Selain itu penambahan asam lemak rantai panjang hidrokarbon, atau gliserida ke dalam medium pertumbuhan *Torulopsis magnoliae* meningkatkan hasil sophorolipid yang diperoleh beberapa kali lipat (Tulloch, 1962 dalam Desai and Desai, 1993).

2. Regulasi melalui represi (hambatan) katabolik

Hambatan katabolik dalam sintesis biosurfaktan oleh glukosa atau metabolit primer adalah salah satu mekanisme regulatori penting yang terjadi pada mikroorganisme. *Acinetobacter calcoacetius* dan *Arthrobacter paraffineus* tidak dapat mensintesis surfaktan ketika ditumbuhkan pada asam organik dan glukosa (Desai and Desai, 1993). Hauser and Karnovsky (1958 dalam Desai and Desai 1993) menunjukkan adanya penurunan yang drastis dalam sintesis rhamnolipid oleh *Pseudomonas aeruginosa* akibat penambahan glukosa, asetat dan asam trikarboksilat dalam medium pertumbuhannya yang berupa substrat gliserol. Hasil serupa juga diperoleh pada sintesis liposan oleh *Candida lipolytica* (Cirigliano and Carman, 1984). Pada *Pseudomonas aeruginosa* diketahui terdapat suatu faktor yang bertanggung jawab terhadap oksidasi n-alkana dan faktor ini disintesis selama pertumbuhannya pada hidrokarbon dan tidak pada substrat glukosa, gliserol ataupun asam palmitat (Hauser and Karnovsky 1958 dalam Desai and Desai, 1993). Sebaliknya, produksi surfaktan oleh *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam substrat glukosa dihambat dengan penambahan hidrokarbon dalam medium tersebut (Cooper *et al.*, 1981). Selain itu Parra *et al.* (1989 dalam Desai and Desai 1993) mengisolasi strain baru (*Pseudomonas aeruginosa* 44T1) yang mampu memproduksi rhamnolipid selama tumbuh pada glukosa, dan strain ini gagal tumbuh atau memproduksi surfaktan dalam substrat n-alkana.

Dalam penelitiannya, Neu and Poralla (1990) menguji kemampuan supernatan kultur dari 126 strain bakteri dalam memproduksi *bioemulsifier*. Empat puluh delapan strain ditemukan memproduksi *bioemulsifier* selama tumbuh dalam substrat glukosa, namun tidak pada substrat hidrokarbon.

3. Efek yang diperantarai nitrogen dan kation multivalensi

Efek sumber nitrogen dan kation multivalensi dalam medium berperan penting dalam metabolisme selular, termasuk produksi biosurfaktan. Di antara garam anorganik yang diuji, garam amonium dan urea merupakan sumber nitrogen yang paling disukai oleh *Acinetobacter paraffineus*. Pada *Pseudomonas fluorescens* diketahui bergantung pada perbandingan atom C : N dalam medium kultur (Persson, 1990).

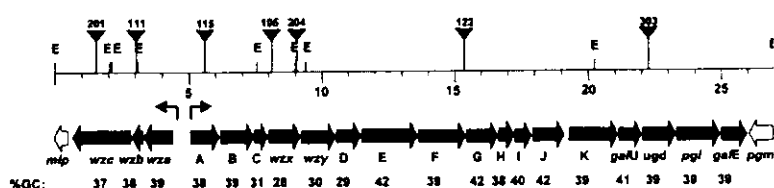
Terbatasnya kation multivalensi dalam medium juga menyebabkan produksi biosurfaktan yang berlebih pada *Pseudomonas* sp. Santos (1986 dalam Desai and Desai 1993) menunjukkan bahwa dengan menurunkan konsentrasi garam magnesium, kalsium, potassium, sodium dan *trace elements* (seperti besi) dalam medium pertumbuhan, dapat dihasilkan rhamnolipid yang lebih banyak. Konsentrasi zat besi sangat memengaruhi produksi biosurfaktan, selain bergantung pada jenis bakteri. Pada *Pseudomonas fluorescens*, terbatasnya konsentrasi zat besi dalam medium dapat menstimulasi produksi biosurfaktan. Pada *Bacillus subtilis* diketahui bahwa penambahan besi dan garam magnesium ke dalam medium pertumbuhan dapat menstimulasi pembentukan surfaktan (Desai and Desai, 1993).

Acinetobacter diketahui mampu memproduksi biosurfaktan dengan berat molekul tinggi yang disebut alasan (Toren *et al.*, . 2002) dan emulsan (Zosim *et al.*, 1986). *Acinetobacter radioresistens* KA53 memproduksi alasan, suatu polisakarida anionik yang mengandung alanin dan protein. Hasil SDS-PAGE dari kompleks senyawa ini menunjukkan terdapat tiga protein (AlnA, AlnB dan AlnC). Ketiga protein ini masing-masing dikode oleh gen *alnA*, *alnB* dan *alnC*. AlnA yang berukuran 45 kDA berperan dalam aktivitas emulsifikasi. Ketiga gen ini telah diklon, disekuon dan diekspresikan ke dalam *E. coli* secara terpisah. Namun masing-masing



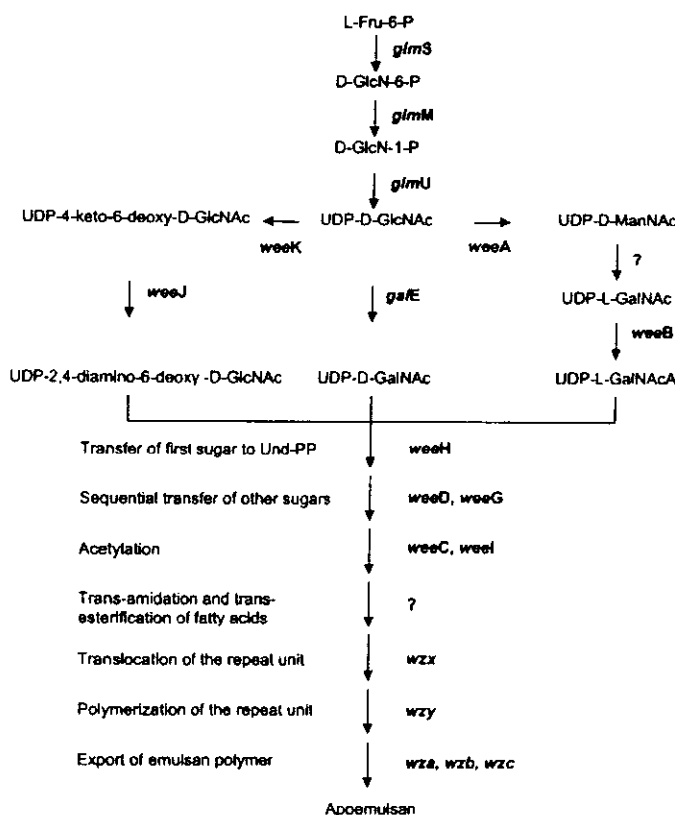
tidak menunjukkan aktivitasnya. Hal ini mengindikasikan bahwa ketiga gen ini akan menghasilkan protein alasan secara bersama-sama dan dalam kondisi tertekan (Rosenberg *et al.*, 2005).

Produksi emulsan oleh *Acinetobacter lwoffii* RAG-1 telah dilaporkan oleh Zosim *et al.* (1986). Kelompok gen (*wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx*, *wzy*) dengan ukuran 27 kb yang berperan dalam produksinya telah dikarakterisasi dan diketahui alur biosintesisnya (Nakar and Gutnick 2001) (Gambar 3 dan 4).



Gambar 3. Organisasi genetik kelompok gen *wee* yang bertanggung jawab terhadap produksi emulsan

(Keterangan gambar. Skala ukuran cluster adalah dalam kilobasa. Segitiga berwarna hitam menunjukkan sisipan transposon Tn10. Nomor di atas segitiga tersebut menunjukkan hubungan atau keterkaitan mutan *A. lwoffii* LN. Panah hitam mewakili sekuen komplit dari ORFs; panah putih mewakili sekuen parsial. Daerah yang ditandai dengan E menunjukkan sisi restriksi *EcoRI*. Daerah promoter ditandai dengan panah hitam tipis. Nama-nama gen ditampilkan di bawah ORFs yang sesuai. ORFs yang berlabel huruf kapital mengacu pada jalur protein spesifik, Wee A-K. Kandungan G-C (mol%) dari masing-masing ORFs disajikan di bawah nama gen. Posisi nomor dari mutan *A. lwoffii* LN adalah (dalam bp): 1520 (LN201), 3071 (LN111), 5601 (LN115), 8171 (LN105), 9025 (LN204), 15.331 (LN122) dan 22.225 (LN303)).



Gambar 4. Alur biosintesis emulsan.

(Keterangan gambar. Fru: Fruktose; GlcN: glukosamin; GlcNAc: N-asetilglukosamin; ManNAc: N-asetilmannosamin; GalNAc: N-asetilgalaktosamin; GalNAcA: N-asetilgalaktosamin asam uronik)

Biosintesis emulsan diawali dengan konversi L-fruktosa-6-fosfat menjadi tiga prekursor gula nukleotida. Gula amino pertama kemudian ditransfer menjadi undecaprenyl fosfat melalui homolog WbaP. Selanjutnya, glikotransferase yang lain menambah dua gula amino dari unit berulang. Ikatan unit berulang dengan membran ditransfer melewati membran plasma oleh homolog Wzx. Polimerisasi diduga terjadi pada permukaan periplasmik membran plasma dan dikatalis oleh Wzy polimerase. Wza dan Wzc terlibat dalam translokasi polisakarida matur melalui membran luar. Meskipun antara kelompok gen Wee dengan kelompok gen lainnya memiliki kesamaan yang cukup besar, fungsi bioemulsifier emulsan relatif tidak sama.

2.4. Klasifikasi dan Mikroba Penghasil Biosurfaktan

Banyak mikroba yang diketahui menghasilkan biosurfaktan, terutama ketika ditumbuhkan pada substrat cair yang sukar larut. Menurut Santos *et al.* (1984 dalam Carillo *et al.* 1996), mikroba dapat memproduksi biosurfaktan ketika ditumbuhkan pada substrat yang tidak larut (seperti hidrokarbon, minyak dan lilin) maupun pada substrat terlarut (karbohidrat). Di antara mikroba-mikroba tersebut, sebagian besar biosurfaktan diproduksi oleh bakteri. Sifat kimia dan fisika yang dimiliki oleh biosurfaktan yaitu menurunkan tegangan permukaan zat cair dan stabilitas emulsi yang dibentuk adalah sangat penting dalam pencarian biosurfaktan yang potensial. Sifat-sifat ini digunakan dalam mengevaluasi biosurfaktan dan dalam skrining mikroba yang berpotensi dalam memproduksi biosurfaktan.

Ron and Rosenberg (2001) mengklasifikasikan biosurfaktan menjadi dua, yaitu:

a. Biosurfaktan dengan berat molekul kecil

Biosurfaktan yang memiliki berat molekul kecil pada umumnya jenis glikolipid atau lipopeptida. Berdasarkan penelitian, glikolipid *bioemulsifier*, rhamnolipid, trehalosa lipid, dan sophorolipid adalah disakarida yang bergabung dengan asam lemak berantai panjang atau hidroksi asam lemak. Trehalosa lipid teridentifikasi sebagai surfaktan ketika trehalosa dimikolat ditemukan pada lapisan emulsi pada kultur cair *Athrobacter paraffineus* ketika sel bakteri ditumbuhkan pada substrat hidrokarbon. Glikolipid dihasilkan oleh banyak jenis mikroba seperti *Rhodococcus erythropolis* atau pada *Torulopsis*. Rhamnolipid yang diproduksi pada beberapa spesies dari *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* menghasilkan lipopeptida siklik (surfaktin).

b. Biosurfaktan dengan berat molekul besar

Sejumlah besar spesies bakteri dari genus yang berbeda memproduksi ekstraselular surfaktan polimer yang mengandung polisakarida, protein, lipopolisakarida, lipoprotein atau campuran kompleks dari biopolimer-biopolimer ini. *Acinetobacter* sp. memproduksi bioemulsan, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 menghasilkan polianionik amfifatik heteropolisakarida *bioemulsifier* yang disebut emulsan. Emulsan sangat efektif mengemulsi hidrokarbon dan air dengan konsentrasi yang sangat rendah (0,001 - 0,01%). Selain itu, emulsan dikenal sebagai salah satu penstabil emulsi yang sangat kuat dengan kemampuan mempertahankan percampuran bahkan pada rasio air: minyak yaitu 1:4 (Ron and Rosenberg, 2001). Banyak jenis dari *Acinetobacter* spp. menghasilkan biosurfaktan dengan berat molekul besar (biosurfaktan polimer) selama fase pertumbuhan pada substrat alkana atau substrat lainnya. Biosurfaktan polimer ini memiliki struktur rantai polisakarida dan asam lemak yang berubah-ubah jika ditumbuhkan pada sumber karbon yang berbeda-beda (Kim *et al.*, 2000). Berikut pada Tabel 1 disajikan beberapa jenis biosurfaktan dan mikroba penghasilnya.

Tabel 1. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba

Pengelompokan Biosurfaktan	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>
	Emulsifier makanan	<i>Candida utilis</i>
	Emulsifier insektisida	<i>Pseudomonas tralucida</i>
	Polisakarida sulfat	<i>Halomonas eurihalina</i>
	Asetil heteropolisakarida	<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>
	Hidroksialkanoiloksi asam alkanoat (HAAs) Prekursor rhamnolipid	<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>
	Selobiosa 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 sp.</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: Mulligan and Gibbs (1993)

2.5. Aplikasi Biosurfaktan

Biosurfaktan menjadi produk bioteknologi yang penting untuk aplikasi industri dan kesehatan dikarenakan kerjanya yang spesifik, toksisitasnya rendah, relatif mudah preparasinya dan dapat diaplikasikan secara luas (Mukherjee and Das, 2010). Biosurfaktan juga menunjukkan peran fisiologis dalam meningkatkan ketersediaan molekul-molekul hidrofobik dan dapat membentuk kompleks dengan logam berat dan mendorong peningkatan degradasi kontaminan kimia (Van Hamme *et al.*, 2006 dalam Mukherjee and Das, 2010). Biosurfaktan dapat digunakan sebagai emulsifier, de-emulsifier, deterjen pada petroleum, petrokimia, manajemen lingkungan, agrokimia, makanan dan minuman, kosmetik dan farmaseutika, deterjen cucian yang diperdagangkan dan industri pertambangan dan metalurgi (Mukherjee and Das, 2010).

Surfaktan dari mikroba umumnya memiliki toksisitas yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan surfaktan kimia, namun lebih efektif dan mudah didegradasi. Penggunaan mikroba penghasil biosurfaktan serta mampu mendegradasi polutan dapat menurunkan biaya *treatment* remediasi lingkungan tercemar minyak. Sejumlah percobaan untuk bioremediasi tanah tercemar minyak dengan menggunakan mikroba dan pemberian biosurfaktan telah banyak dilakukan dan berhasil. Biosurfaktan rhamnolipid dari *P. aeruginosa* menstimulasi pengambilan komponen hidrofobik yang pada akhirnya memacu degradasi polutan (Noordman and Janssen dalam Mukherjee and Das, 2010). Das dan Mukherjee (2007) menunjukkan tentang efisiensi biodegradasi minyak petroleum dari *B. subtilis* DM-04 dan strain *P. aeruginosa* M dan NM yang diisolasi dari tanah tercemar minyak petroleum. Penelitian menunjukkan bahwa ketiga bakteri merupakan produser biosurfaktan yang efisien pada tanah tercemar minyak yang memberikan keuntungan karena tersedia di

alam secara terus menerus, nontoksik, dapat didegradasi, dan biaya yang dibutuhkan jauh lebih rendah dibanding metode lainnya.

Biosurfaktan memiliki kemampuan yang baik dalam mengemulsi hidrokarbon. Hal ini yang menyebabkan biosurfaktan digunakan sebagai deterjen dalam pembersihan tangki penyimpanan minyak mentah atau hidrokarbon. Banat *et al.* (1991 dalam Mukherjee and Das, 2010) melaporkan kemampuan biosurfaktan yang dihasilkan oleh strain bakteri (Pet 1006) untuk pembersihan tangki penyimpanan minyak dan untuk *recovery* hidrokarbon dari *sludge* yang teremulsi. Pada uji pembersihan tangki minyak, sekitar 91 % minyak mentah bisa didapatkan dari total *sludge*.

Biosurfaktan dapat diaplikasikan dalam industri makanan, seperti untuk mengontrol penggumpalan globula-globula lemak, menstabilkan sistem aerasi, meningkatkan tekstur produk yang mengandung pati, memodifikasi sifat rheologi adonan dari tepung dan meningkatkan konsistensi dan tekstur produk berbahan dasar lemak (Mukherjee and Das, 2010). Akhir-akhir ini suatu bioemulsifier produk *Enterobacter cloaceae* yang diisolasi dari laut digunakan sebagai bahan untuk meningkatkan viskositas dalam industri makanan, terutama makanan yang pHnya rendah karena mengandung asam seperti asam sitrat atau asam askorbat (Iyer *et al.*, 2006 dalam Mukherjee and Das, 2010).

Surfaktan seperti asam lemak polimerik atau alkil sulfonat rantai pendek digunakan untuk hidrofilisasi tanah berat pada sektor industri. Biodegradasi pestisida klorinat dan endosulfan menggunakan biosurfaktan produk *B. subtilis* MTCC2423 telah dilaporkan oleh Ashwati *et al.* (1999 dalam Mukherjee and Das, 2010). Biosurfaktan dapat meningkatkan 40 % biodegradasi dari pestisida-pestisida tersebut. Biosurfaktan rhamnolipid dari Genus *Pseudomonas* diketahui memiliki

aktivitas antimikroba. Zonix™ *biofungicide*, yang merupakan produk dagang berisi campuran dua biosurfaktan rhamnolipid, diklaim sebagai biofungisida untuk mencegah dan mengontrol fungi patogen pada tanaman hortikultura dan pertanian (Mukherjee and Das, 2010).

Mukherjee (2007) melaporkan bahwa biosurfaktan *Cyclic lipopeptides* (CLPs) yang diproduksi oleh strain anggota Spesies *B. subtilis* menunjukkan kemampuan membentuk emulsi yang bagus dengan minyak sayur. Biosurfaktan tersebut menunjukkan kompatibilitas dan stabilitas yang lebih baik dibandingkan deterjen komersial, stabil pada pH 7-12 dan tidak kehilangan sifat aktif permukaan pada pemanasan 80 °C selama 60 menit.

Penelitian menunjukkan bahwa biosurfaktan lipopeptida yang diproduksi *B. subtilis* menunjukkan aktivitas insektisida terhadap lalat buah *Drosophila melanogaster* (Assie *et al.*, 2002 dalam Mukherjee and Das, 2010). *Cyclic lipopeptides* (CLPs) yang disekresi oleh dua strain anggota Spesies *B. subtilis* dapat membunuh larva instar ketiga dari *Culex quinquefasciatus* setelah 24 jam perlakuan. Senyawa CLPs dari *B. subtilis* tidak sensitif terhadap paparan UV atau sinar matahari. Senyawa CLPs menunjukkan stabilitas terhadap radiasi UV yang lebih besar dibanding toksin insektisida *bactoculicide* (*Bti*) dan *B. sphaericus*. *Crude CLPs* dapat bertahan pada lingkungan yang tercekam seperti pH ekstrim, radiasi sinar UV dan matahari, dan tidak toksik terhadap hewan uji vertebrata akuatik *Labeo rohita* hingga konsentrasi yang menyebabkan kematian larva nyamuk (Das and Mukherjee, 2006). Berdasarkan sifat-sifat ini, maka senyawa tersebut dapat dimanfaatkan untuk formulasi biopestisida baru, yang efektif dan aman untuk pengendalian larva nyamuk.

Rhamnolipid yang diproduksi *P. aeruginosa*, lipopeptida yang diproduksi *B. subtilis* dan *B. licheniformis* serta mannosylerythritol lipid dari *C. antarctica* memiliki aktivitas antimikroba. Rhamnolipid dari *P. aeruginosa* memiliki aktivitas algicidal terhadap alga yang berbahaya. Surfaktin dilaporkan memiliki sifat hemolisis dan menghambat pembentukan benang fibrin yang mengindikasikan berpotensi untuk digunakan dalam sektor farmaseutika. Iturin yang diproduksi oleh *B. subtilis* dilaporkan mempunyai sifat sebagai antifungi. Pumilacidin, analog dengan surfaktin mempunyai efek menghambat virus herpes simplex 1 (HSV-1), H₂K₂-Atpase dan *ulser gastic in vivo*. Itokawa *et al.* (1994 dalam Mukherjee and Das, 2010) melaporkan bahwa aplikasi surfaktin terhadap HIV-1 menunjukkan bahwa kelompok biosurfaktan ini merupakan kandidat yang rasional untuk pengembangan obat HIV.

2.6. Karakteristik Biosurfaktan

Karakteristik utama biosurfaktan adalah ditunjukkan dengan aktivitasnya dalam menurunkan tegangan permukaan antara dua zat cair serta kemampuannya dalam mengemulsi dua zat yang berbeda kepolarannya. Tegangan permukaan adalah gaya yang bekerja sejajar dengan permukaan cairan untuk mengimbangi gaya kohesi dari molekul di dalam zat cair terhadap molekul di permukaan sehingga molekul tersebut dapat tetap di permukaan (Desai and Banat, 1997). Pengukuran tegangan permukaan dapat menggunakan empat macam metode yaitu : a) metode kenaikan cairan dalam pipa kapiler, b) metode tekanan maksimum gelembung, c) metode tetes dan d) metode cincin.

Emulsifikasi merupakan mekanisme penting bagi mikroba untuk mencapai substrat yang melibatkan biosurfaktan sebagai emulgator. Emulsi terjadi apabila dua fluida atau lebih tercampur dan salah satu fluida terdispersi ke dalam fluida yang

lainnya. Emulsi pada umumnya merupakan sistem yang mempunyai butiran berdiameter heterogen, tidak stabil, dan lebih besar daripada 1000 Å. Berdasar fase terdispersinya dikenal dua jenis emulsi yaitu: (1) emulsi minyak dalam air, dan (2) emulsi air dalam minyak (Desai and Banat, 1997).

Kondisi suatu sistem mencapai titik kritis, jika molekul-molekul amfifatik dari biosurfaktan bergabung membentuk misel-misel, yang ditandai dengan tidak turunnya tegangan permukaan meskipun terjadi penambahan konsentrasi biosurfaktan. Nilai konsentrasi biosurfaktan memiliki tegangan permukaan stabil untuk pertama kalinya diketahui sebagai nilai *Critical Micelle Concentration* (Desai and Banat, 1997). *Critical Micelle Concentration* atau CMC dinyatakan sebagai kemampuan biosurfaktan yang larut di antara fase air, dan sebagai tolok ukur efisiensi biosurfaktan. Pengukuran CMC dilakukan dengan penambahan supernatan dari kultur mikroba atau biosurfaktan secara bertingkat pada akuades, dan tiap-tiap penambahan diukur tegangan permukaannya (Desai and Banat, 1997).

Semakin kecil nilai CMC, semakin sedikit kuantitas biosurfaktan (gram) dalam setiap liter air yang dibutuhkan dan masih efektif bersifat sebagai senyawa aktif permukaan. Suatu biosurfaktan dikatakan efisien jika memiliki nilai 1- 2000 mg/l. Efektivitas biosurfaktan yang baik, jika mampu mencapai kondisi tegangan permukaan dan antarmuka yang stabil dengan nilai CMC kurang dari 30 mg/l (Mulligan and Gibbs, 1989 dalam Kosaric, 1993).

Pada konsentrasi biosurfaktan yang lebih kecil dari nilai CMC, nilai tegangan permukaan bergantung pada konsentrasi molekul monomerik biosurfaktan. Jika konsentrasi biosurfaktan terus diperkecil, maka terjadi peningkatan tegangan permukaan air. Titik kritis mulai lepasnya misel setelah pengenceran disebut *Critical Micelle Dilution* (CMD) (Carillo, 1996).

Biosurfaktan mempunyai kestabilan yang berbeda-beda terhadap pengaruh suhu sebagaimana telah dilaporkan Kim *et al.* (2000). Biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Nocardia* sp. pada substrat heksadekana stabil terhadap suhu hingga 60 °C.

Cooper and Godenberg (1997) dalam penelitiannya telah memperoleh hasil bahwa aktivitas emulsi dari biosurfaktan polimer turun secara drastis antara pH 6,5-7. Hal ini adalah rentang pH untuk protonasi dari amina primer, yaitu proses hilangnya muatan positif dari monosakarida glukosamina. Meningkatnya pH dapat menghilangkan sifat pengemulsi dari suatu polimer.

Stabilitas suhu merupakan salah satu sifat biosurfaktan yang dapat memengaruhi efektivitas dan komersialisasi biosurfaktan, di samping stabilitas pH dan kadar garam (Mulligan and Gibbs, 1993 dalam Kosaric, 1993). Biosurfaktan dapat diaplikasikan di bidang industri pengilangan minyak (MEOR) jika stabil pada kisaran suhu yang luas, yaitu tetap bersifat aktif permukaan dan sebagai *emulsifier*. Jadi struktur amfifatik biosurfaktan tidak rusak akibat perubahan suhu ekstrim (Pruthi and Cameotra, 1997).

Anggota Genus *Acinetobacter* juga memiliki karakteristik biosurfaktan yang spesifik, karena bagian hidrofobik dari molekul amfifatik dibentuk oleh asam lemak yang percabangan dan panjang rantainya berbeda satu dengan spesies yang lain. Cabang yang mengandung gugus asam lemak akan berikatan dengan cabang yang mengandung gugus asam amino (Finnerty, 1989 dalam Kosaric, 1993). Bagian hidrofilik dari molekul amfifilik umumnya berupa peptida siklik yang mengandung tujuh asam amino (Jenny *et al.*, 1993 dalam Kosaric, 1993).

Bioemulsan seperti emulsan RAG1 diproduksi oleh *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg and Ron, 2001) memiliki berat molekul sekitar 1000 kD. Jenis emulsan lain dikenal dengan nama alasan, yaitu kompleks polisakarida anionik

dan protein dengan berat molekul sekitar 1.000 kD, diisolasi dari *Acinetobacter radioresistens*. Emulsi ini mengandung 15 % asam lemak dan dapat diproduksi pada substrat 2 % etanol. Kebanyakan akumulasi surfaktan terjadi pada fase stasioner. Emulsi tidak dapat mengemulsi hidrokarbon murni pada konsentrasi 0,001 sampai 0,01 %, tetapi dapat mengemulsi campuran dari hidrokarbon alifatik dan aromatik. Kemampuan emulsifikasi optimal terjadi dengan penambahan 2 sampai 10 mM magnesium dan nilai pH berkisar antara 5 – 7,5. Ketika emulsi diproduksi pada *crude oil* (Rosenberg and Ron, 2001), awalnya emulsi menempel ke sel selama fase pertumbuhan eksponensial. Setelah substrat berkurang, emulsi diekskresikan dan membentuk polimer berupa film pada tetesan minyak.

Karakterisasi terhadap produk biosurfaktan yang dihasilkan mikroba dapat dilakukan pada supernatan kultur, ekstrak kasar, maupun produk hasil purifikasi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut organik yang sesuai atau dengan pengendapan senyawa tertentu. Pemilihan metode ekstraksi biosurfaktan bergantung pada ion-ion yang dimilikinya, kelarutannya dalam air, dan produksinya secara intraselular, ekstraselular, atau berikatan dengan sel (Desai and Desai, 1993 dalam Kosaric, 1993).

Ekstraksi biosurfaktan dapat dilakukan dengan pengendapan koloid dari supernatan kultur bakteri dan fraksinasi berdasarkan tingkat kepolarannya. Proses fraksinasi biosurfaktan dilakukan untuk memudahkan analisis kandungan senyawa kimia yang menyusunnya dan mengetahui keberadaan senyawa aktif yang diperoleh (Sim *et al.*, 1997). Ekstraksi biosurfaktan dengan bermacam pelarut diperlukan untuk memilih metode ekstraksi terbaik yang dapat memberikan hasil yang lebih optimal, sedangkan karakterisasi diperlukan untuk mengetahui aktivitas dan efektivitas

biosurfaktan yang dihasilkan dan prospek aplikasinya. Beberapa jenis biosurfaktan diperoleh dengan metode ekstraksi pengendapan ammonium sulfat, antara lain senyawa pengemulsi dan biodispersi yang dihasilkan *Acinetobacter* spp., bioemulsifikasi dari bakteri Gram negatif, dan pengemulsi dari *Bacillus subtilis* FE-2.

Hasil pengembangan proses pemurnian yang baru, Mercaldi *et al.* (2008) telah menemukan bahwa emulsi merupakan kompleks dari sekitar 80 % (w/w) lipopolisakarida (LPS) dan 20 % (w/w) eksopolisakarida (EPS) dengan berat molekul tinggi. Senyawa EPS dimurnikan menjadi 98 % (w/w) dengan menggunakan filtrasi aliran tangensial (*tangential flow filtration*), ekstraksi fasa Triton X-114, presipitasi amonium sulfat dan kromatografi interaksi hidrofobik.

Acinetobacter radioresistens KA53 yang diisolasi dengan medium kaya, menghasilkan bahan pengemulsi yang tidak dapat didialisis (disebut alasan) ketika ditumbuhkan pada medium etanol dalam reaktor *batch-fed*. Emulsifier kasar (*crude*) dikonsentrasikan dari cairan kultur bebas sel (supernatan) dengan menggunakan pengendapan ammonium sulfat dan menghasilkan 2,2 g/L emulsifier (Navon-Venezia *et al.*, 1995).

Setelah penambahan amonium sulfat hingga 65 % jenuh dan dibiarkan semalam pada suhu 4 °C, suspensi keruh disentrifugasi pada 10.000 g selama 20 menit. Pelet dilarutkan dalam air, didialisis dengan air deionisasi, dan diliofilisasi, menghasilkan 3,5 g alasan. Apoalasan (alasan yang dihilangkan komponen proteinnya) diperoleh dengan metode fenol panas (Westphal and Jann, 1965 dalam Toren *et al.*, 2001). Setelah dua kali perlakuan fenol panas secara suksesif, apoalasan berisi protein kurang dari 1 %. Larutan stok alasan dan apoalasan

disiapkan dengan hidrasi pada 0 °C dalam 20 mM Tris HCl (pH 8,5) (Toren *et al.*, 2001).

Phetrong *et al.* (2008) membandingkan empat metode presipitasi untuk mendapatkan ekstrak kasar bioemulsifier dari *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu* SM7. Keempat metode tersebut adalah pengendapan dengan amonium sulfat, acetone, etanol, dan metanol. Di antara keempat metode, presipitasi etanol merupakan metode yang paling efisien dalam memperoleh bioemulsifier dari supernatan kultur bakteri. Produk biosurfaktan yang diperoleh adalah 2,94 g/L, 1,04 g/L, dan 0,76 g/L dengan nilai *Critical Emulsifier Concentration* (CMC) adalah 0,04 g/mL, 0,06 g/mL, dan 0,05 g/ml masing-masing untuk pelarut etanol, aseton dan metanol. Presipitasi dengan amonium sulfat tidak diperoleh bioemulsifier dari supernatan kultur. Goldman *et al.* (1982; Rosenberg *et al.*, 1979; dan Shabtai *et al.*, 1985 dalam Desai and Banat, 1997) menyatakan bahwa metode presipitasi dengan amonium sulfat telah berhasil digunakan dalam isolasi emulsi dan biodispersan dari *Acinetobacter calcoaceticus* A2 serta bioemulsifier dari bakteri Gram negatif yang belum diidentifikasi.

Alasan dapat menstabilkan berbagai emulsi minyak dalam air, termasuk n-alkana dengan panjang rantai 10 atau lebih, aromatik alkil, parafin cair, minyak kedelai dan kelapa, dan minyak mentah. Alasan memiliki kemampuan mengemulsi 2,5 sampai 3,0 kali lebih aktif setelah dipanaskan pada 100 °C dalam kondisi netral atau basa. Aktivitas emulsifikasi diamati pada rentang pH yang dipelajari (pH 3,3-9,2) dengan maksimum pada pH 5,0. Ion Magnesium merangsang aktivitas alasan pada kondisi pH 3,3-4,5 dan pH 5,5-9,3 yaitu di bawah atau di atas pH optimum. Aktivitas alasan lebih tinggi dalam 20 mM sitrat daripada 20 mM asetat atau buffer Tris-HCl. Secara kimiawi menunjukkan bahwa alasan merupakan kompleks anionik

dengan berat molekul tinggi, yaitu heteropolisakarida dengan kandungan alanin dan protein (Navon-venezia *et al.*, 1995).

Beberapa polimer biosurfaktan yang telah dihasilkan oleh spesies anggota Genus *Acinetobacter* dari penelitian terdahulu ditunjukkan dalam Tabel 1 (Gutnick and Bach, 2008).

Tabel 2 Polimer Biosurfaktan yang dihasilkan oleh spesies anggota Genus *Acinetobacter*

Strain	Produk	Komponen Fungsional	Size (kDa)	Referensi
<i>A. venetianus</i> RAG-1	Emulsan Apoemulsan	Polisakarida*	10 ³	Rosenberg <i>et al.</i> (1979); Zuckerberg <i>et al.</i> (1979)
<i>A. calcoaceticus</i> BD4;BD413	UN	Polisakarida+ protein	10 ³	Kaplan <i>et al.</i> (1987)
<i>A. radioresistans</i> KA53	Alasan	OmpA-like protein	38-45	Toren <i>et al.</i> (2002) Walzer <i>et al.</i> (2006)
<i>A. sp.</i> A2	Biodispersan	Polisakarida	51	Rosenberg <i>et al.</i> (1988)
<i>A. junii</i> SC14	UN	NR	NR	Patil and Chopade (2001)
<i>A. junii</i> SpL1	UN	NR	NR	Menezes Bento <i>et al.</i> (2005)

Keterangan:

UN = *Unnamed* (tidak disebutkan namanya)

NR = *Not reported* (tidak dilaporkan)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1. Tujuan Umum

Mengali dan mengoptimasi sumber daya hayati mikroba penghasil surfaktan yang berpeluang untuk menggantikan surfaktan kimia sintetik untuk mengurangi pencemaran lingkungan.

3.1.2. Tujuan Khusus

Tahun I

1. Mengetahui konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi yang optimum untuk produksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1).
2. Mengetahui karakteristik biosurfaktan yang diproduksi oleh *Acinetobacter* sp. P2(1) dalam substrat glukosa.
3. Mengetahui nama jenis atau strain bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) berdasarkan sekuen 16S rDNA.

Tahun II

4. Mengetahui jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter* sp. P2(1).

Tahun III

5. Mengetahui gen yang menyandi produksi biosurfaktan pada *Acinetobacter* sp. P2(1).

1.2. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Karakteristik dan jenis biosurfaktan yang dihasilkan bakteri uji dapat diketahui sehingga dapat digunakan untuk mengetahui efektivitas biosurfaktan tersebut untuk berbagai aplikasi serta memudahkan pemilihan substrat dalam upaya over produksi dan memahami jalur biosintesisnya.
2. Bakteri uji *Acinetobacter* sp. P2(1) teridentifikasi secara filogenetik, sehingga dapat diketahui kemungkinan ditemukannya spesies atau strain baru.
3. Gen yang menyandi produksi biosurfaktan dapat diketahui sehingga nantinya akan memudahkan upaya rekayasa genetika terhadap bakteri uji.

BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dalam tiga tahapan. Penelitian tahap pertama (tahun I) dilakukan karakterisasi produk biosurfaktan dan identifikasi bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) secara filogenetik berdasarkan sekuen 16S rDNA. Karakterisasi yang dilakukan meliputi : pengukuran nilai tegangan permukaan (*surface tension*) kultur bebas sel, pengukuran aktivitas emulsifikasi biosurfaktan terhadap minyak uji, Nilai *Critical Micelle Concentration* (CMC), Nilai *Critical Micelle Dilution* (CMD), serta kestabilan produk terhadap pengaruh variasi suhu dan pH. Ekstrak kasar biosurfaktan dianalisis komponen kimia penyusunnya. Penelitian tahap kedua (tahun II) adalah identifikasi jenis biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) melalui tahap purifikasi produk dan analisis komponen penyusun biosurfaktan. Penelitian tahap ketiga (tahun ketiga) adalah analisis gen penyandi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) melalui amplifikasi dengan PCR. Amplikon yang diperoleh pada proses PCR disekuensing, dan urutan basa nukleotida yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan urutan gen penyandi biosurfaktan beberapa mikroorganisme yang terdapat dalam *database GenBank*.

Tahun Pertama

4.1. Biosintesis biosurfaktan oleh *Acinetobacter* sp. P(2)1

Media produksi biosurfaktan terdiri dari 200 ml air mineral sintetik (Pruthi dan Cameotra, 2003), yang berisi (dalam mg/l) KH_2PO_4 2000; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2000; K_2SO_4 350; NaNO_3 2000; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 150; NaCl 100; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50; CaCl_2 50; dan 1 ml *trace elements* yang terdiri dari (dalam mg/l): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 525; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 705; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200; H_3BO_3

15; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 27. Substrat glukosa (1, 2, dan 3% w/v) dan suspensi mikroba uji sebanyak 3% (v/v) dengan nilai absorbansi 0,5 yang diukur pada panjang gelombang 600 nm. Kultur diinkubasi selama 0, 1, 2, 3, dan 4 hari, pada *shaker* dengan agitasi 120 rpm pada suhu 30°C. Setiap waktu inkubasi, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm, 25 menit pada suhu 4°C. Adanya biosurfaktan diindikasikan melalui pengukuran tegangan permukaan supernatan kultur menggunakan tensiometer du Nouy dan pengukuran aktivitas emulsifikasi supernatan kultur menggunakan empat jenis hidrokarbon minyak yaitu : *crude oil*, minyak goreng, solar dan minyak tanah. Aktivitas emulsifikasi dilakukan dengan mengambil 1 ml supernatan ditambah dengan 1 ml minyak uji. Campuran dihomogenasi menggunakan *Vortex mixer* selama 2 menit dan diendapkan. Fase emulsi yang terbentuk diukur dan dimasukkan dalam rumus untuk menghitung persentase emulsi yang terbentuk. Kestabilan emulsi diamati dalam kurun waktu 1 dan 24 jam dan dinyatakan dengan nilai AE (1jam) dan AE(24 jam).

4.2. Ekstraksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1).

Kultur bakteri dengan produksi biosurfaktan tertinggi (parameter yang diukur adalah tegangan permukaan dan emulsifikasi biosurfaktan terhadap hidrokarbon solar dan kerosin) selanjutnya diekstraksi, pH medium diukur untuk mengetahui perubahan pH kultur bakteri selama proses produksi biosurfaktan. Kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan sel dari supernatan. Supernatan yang mengandung biosurfaktan diekstraksi menggunakan metode pengendapan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Kim *et al.*, 2000). Supernatan kultur bakteri diendapkan dengan 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan diinkubasi dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C semalaman. Supernatan kultur bakteri diendapkan dengan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sampai pH 2 dan diinkubasi dalam lemari pendingin

dengan suhu 4°C semalaman. Selama proses ekstraksi akan didapatkan fase endapan dan filtrat yang kemudian kedua fase tersebut diliofilisasi. Serbuk hasil liofilisasi dari dua fase tersebut merupakan produk kasar biosurfaktan. Produk tersebut ditimbang dengan neraca analitik Shimadzu AEL – 200 dan dilakukan karakterisasi produk endapan biosurfaktan.

4.3. Karakterisasi supernatan dan produk biosurfaktan.

Karakterisasi supernatan dan produk biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dilakukan dengan berbagai uji aktivitas. Karakterisasi supernatan kultur meliputi: (a) pengukuran tegangan permukaan, (b) pengukuran aktivitas emulsifikasi dan stabilitas emulsi terhadap berbagai jenis hidrokarbon, sedangkan karakterisasi produk biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dari setiap metode ekstraksi meliputi: (a) pengukuran tegangan permukaan, (b) nilai aktivitas emulsifikasi dan (c) stabilitas emulsi terhadap berbagai jenis hidrokarbon, (d) stabilitas emulsi dan tegangan permukaan terhadap perubahan suhu dan pH, (e) CMC (*Critical Micelle Concentration*), (f) CMD (*Critical Micelle Dilution*), dan (g) komponen kimia biosurfaktan.

a) Pengukuran tegangan permukaan dan *Critical Micelle Dilution* (CMD)

Larutan biosurfaktan dibuat dengan melarutkan serbuk biosurfaktan ke dalam 10 ml *Ultra High Pure Water* (UHPW). Supernatan kultur dan larutan biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) diukur tegangan permukaannya dengan menggunakan tensiometer Du Nouy. Setiap sampel diencerkan secara bertingkat, yaitu 20 kali, 50 kali, 100 kali, 200 kali, dan 300 kali dengan penambahan UHPW untuk diukur tegangan permukaannya.

Pengenceran dihentikan sampai nilai tegangan permukaan sampel mendekati nilai tegangan permukaan UHPW. Titik kritis tercapai jika nilai

tegangan permukaan mulai naik untuk pertama kalinya dan titik kritis tersebut merupakan nilai CMD biosurfaktan dalam supernatan/CMD biosurfaktan dalam UHPW. Nilai tegangan permukaan dinyatakan dalam dyne/cm dan dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 3 ulangan.

b) *Critical Micelle Concentration (CMC)*

Larutan biosurfaktan dibuat dengan melarutkan serbuk biosurfaktan ke dalam *Ultra High Pure Water* (UHPW). Setiap 10 ml larutan biosurfaktan dengan konsentrasi berbeda diukur tegangan permukaannya dengan tensiometer Du Nouy. Pengukuran dihentikan saat titik kritis tercapai, yaitu nilai tegangan permukaan larutan biosurfaktan tetap atau tidak mengalami penurunan lagi meskipun konsentrasi biosurfaktan dinaikkan. Titik kritis tersebut merupakan nilai CMC larutan biosurfaktan dan dinyatakan sebagai $\gamma = \text{mN/m}$.

c) Aktivitas emulsi dan stabilitas emulsi pada berbagai hidrokarbon uji

Aktivitas emulsi terhadap hidrokarbon uji (heksadekana, kerosin, minyak nabati, pelumas, dan solar) diukur dengan menggunakan metode Suryatmana *et al.* (2006). Satu mililiter supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 1 ml minyak uji. Kedua larutan dicampur menggunakan Vortex selama 2 menit, aktivitas emulsifikasi yang terbentuk diamati setelah 1 jam dan 24 jam inkubasi. Aktivitas emulsifikasi diamati dengan mengukur tinggi emulsi (cm) terhadap tinggi total cairan (cm) dikali 100% (Pruthi and Cameotra, 1997).

d) Stabilitas biosurfaktan terhadap perubahan suhu

Larutan biosurfaktan, yaitu serbuk biosurfaktan yang dilarutkan ke dalam akuades dengan konsentrasi biosurfaktan (nilai CMC), diinkubasi pada suhu berbeda (20 – 80°C) selama 24 jam. Jika biosurfaktan masih bersifat aktif

permukaan pada kisaran suhu 20°C-60°C, yaitu mampu menurunkan tegangan permukaan dan mengemulsi hidrokarbon, maka biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) tersebut berpotensi untuk diaplikasikan dalam industri pengilangan minyak (MEOR).

e) Stabilitas biosurfaktan terhadap perubahan pH

Larutan biosurfaktan dengan konsentrasi sesuai nilai CMC, diinkubasi selama 24 jam pada pH berbeda (pH 2 - 12).

4.4. Analisis kualitatif komponen kimia

Analisis kualitatif komponen kimia biosurfaktan yang dilakukan meliputi :

a). Uji Karbohidrat

Uji Fehling A dan B merupakan reagen yang digunakan untuk mengetahui keberadaan karbohidrat dalam larutan biosurfaktan. Penambahan masing-masing 1ml fehling A dan Fehling B pada 2 ml larutan biosurfaktan. Uji dikatakan positif jika terbentuk warna merah bata serta timbul endapan. Uji fehling berdasarkan reduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ oleh gugus aldehyd atau keton bebas dalam suasana alkalis, biasanya ditambahkan zat pengompleks seperti sitrat atau tartrat untuk mencegah terjadinya pengendapan CuCO_3 .

b). Uji Protein

Uji Biuret merupakan reagen yang digunakan untuk mengetahui keberadaan protein dalam larutan biosurfaktan. Penambahan 0,25 ml reagen Biuret (larutan CuSO_4 alkalis) ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml larutan biosurfaktan (hasil ekstraksi cair-cair bertingkat) . Uji dikatakan positif jika terbentuk senyawa kompleks berwarna ungu akibat bereaksinya CuSO_4 alkalis dengan senyawa yang mengandung 2 atau lebih atom ikatan peptida. Intensitas warna menunjukkan jumlah ikatan peptida yang ada dalam protein.

c). Uji Asam Lemak

Produk kasar biosurfaktan dianalisis dengan spectrometer GC-MS untuk menganalisa bagian hidrofob. Analisa bagian non polar biosurfaktan *Acinetobacter* sp P2(1) dengan menggunakan spectrometer GC-MS. Sampel biosurfaktan dihidrolisis parsial dengan menggunakan 12 N HCl-CH₃COOH (2:1) pada 60°C selama 7 jam. Setelah dihidrolisis parsial komponen hidrofob dari biosurfaktan diekstraksi dengan n-heksan. Fraksi n-heksan yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotary vacuum evaporator. Ekstrak kental ini kemudian dianalisa dengan spektrometer GC-MS.

d). Uji Fosfat

Diambil 2 ml larutan sampel (hasil ekstraksi cair-cair bertingkat) ditambah 0,15 ml HCl encer kemudian dihomogenkan. Selanjutnya ditambah 0,15 ml reagen barium nitrat Ba(NO₃)₂ dan dihomogenkan kembali. Campuran yang terbentuk diamati oleh adanya endapan yang terjadi. Uji positif ditunjukkan dengan adanya endapan kristal berwarna putih.

4.5. Identifikasi bakteri berdasarkan sekuen 16S rDNA

Isolasi DNA kromosom bakteri. DNA kromosom bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) diisolasi menggunakan metode Zyskind and Bernstein (1992). Biakan *Acinetobacter* sp. P2(1) dalam medium nutrisi agar miring diambil satu ose, dan diinokulasikan ke dalam 50 ml medium cair Luria Bertani (Brown, 2010) dengan komposisi tripton (10 g/l), yeast ekstrak (5 g/l), dan NaCl (10 g/l). Kultur cair bakteri diinkubasi selama 24 jam pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm. kultur sebanyak 1,5 ml dimasukkan ke dalam tabung ependorf, disentrifugasi selama 20 menit, pada suhu 4°C dengan kecepatan 3000 x g. Supernatan dibuang, sementara pelet sel yang diperoleh ditambah dengan kultur 1,5 ml dan disentrifugasi dengan

kondisi yang sama dengan di atas. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 400 μ l EDTA 50 mM, selanjutnya disentrifugasi (3000 x g, 15 menit, 4°C). Supernatan dibuang, sementara pelet yang diperoleh ditambah 200 μ l larutan sukrosa 25% dan 70 μ l EDTA 0,5 M pH 8 (9:1). Campuran dihomogenkan, kemudian ditambah 10 μ l lisozim 10 mg/ml, diinkubasi selama 1 jam, pada suhu 37°C. Suspensi campuran ditambah dengan buffer lisis yang tersusun atas 120 μ l NaCl 5 M, 70 μ l EDTA 0,5 M, dan 150 μ l SDS 20%, kemudian ditambah dengan 10 μ l proteinase K 5 mg/ml, suspensi digoyang secara perlahan agar perlahan. Selanjutnya dihomogenasi menggunakan *Vortex mixer* dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam. Suspensi ditambah kloroform dengan perbandingan 1:1 (v/v), kemudian dibolak-balik secara perlahan selama 20 menit. Suspensi akan terpisah menjadi 2 fasa, fasa bening terletak di bagian atas, sementara fasa putih seperti busa terletak di bagian bawah. Suspensi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3000 x g selama 15 menit. Lapisan teratas hasil sentrifugasi dipipet dan dipindah ke tabung ependorf baru (DNA terletak pada lapisan ini). Selanjutnya, cairan yang mengandung DNA ini (supernatan) ditambah dengan etanol absolut sebanyak 2 kali volume supernatan. Etanol absolut berfungsi untuk mengendapkan DNA. Campuran ini dibalik-balik secara perlahan, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet DNA yang diperoleh dipisahkan dari supernatan, dengan cara membuang supernatan. Pelet DNA ditambah dengan 500 μ l etanol 70% yang berfungsi untuk mencuci DNA. Suspensi dihomogenkan dengan menggunakan pipet, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan hati-hati, dan pelet dikeringkan pada suhu 55°C selama 15 menit. Pelet DNA disuspensikan dengan 120 μ l *buffer* TE. Suspensi DNA disimpan pada suhu -20°C.

Verivikasi DNA bakteri. Bahan genetik (DNA) hasil isolasi diverivikasi dengan elektroforesis. Dua ratus lima puluh mili liter larutan buffer TAE 1x dibuat dengan cara mencampurkan 30 ml TAE 10x ke dalam 270 ml akuades steril. Gel agarosa 1% disiapkan dengan cara menimbang agarosa 0,2 g dan dilarutkan ke dalam bufer TAE 1x hingga volume 20 ml. Larutan agarosa dididihkan hingga larut sempurna. Baki gel agarosa disiapkan dan dipasang sisir untuk membuat sumuran di salah satu ujung baki gel agarosa dengan posisi hampir menyentuh dasar baki. Suhu larutan agarosa diperiksa dengan cara menempelkan Erlenmeyer ke tangan, jika suhunya sudah turun hingga sekitar 50-60°C, maka larutan agarosa ditambah dengan 1 µl *ethidium bromide*. Larutan agarosa dihomogenkan sebentar, kemudian dituangkan ke dalam baki gel agarosa, dibiarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat. Sisir untuk membuat sumuran diambil secara perlahan kemudian baki berisi gel agarosa dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi larutan bufer TAE 1x (dipastikan bahwa gel terendam seluruhnya dalam larutan TAE). Lima sentimeter kertas parafilm disiapkan dan diletakkan di dekat tangki elektroforesis. Sepuluh mikroliter sampel DNA dan 2 µl *loading dye* dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas *parafilm* menggunakan mikropipet. Elektroforesis dijalankan selama 20 menit (100 V), selanjutnya visualisasi pita DNA yang terisolasi diamati menggunakan UV transluminator.

ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) 16S rDNA. Analisis fragmen restriksi gen 16S rDNA dilakukan dengan metode *Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)* menurut De Baere *et al.* (2002). DNA kromosomal bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) hasil isolasi disentrifugasi pada 3600 x g, empat derajat Celcius selama satu menit, kemudian digunakan sebagai cetakan dalam

amplifikasi gen 16S rDNA yang menyandikan 16S rDNA dengan *thermocycler Gene Cycler* (Biorad). *Primer* yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rDNA adalah primer P0 (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') dan P6 (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') dari Roche yang merupakan primer universal untuk berbagai strain bakteri (Scortichini *et al.*, 2002). *Primer* tersebut dirancang oleh Grifoni *et al.* (1995 dalam Scortichini *et al.*, 2002) berdasarkan sekuen ujung 5' dan 3' gen 16S rRNA yang terkonservasi (posisi 27f dan 1495r pada 16S rDNA *Escherichia coli*) dan memungkinkan amplifikasi hampir keseluruhan gen. Campuran untuk reaksi PCR dalam *thin tube* (tabung untuk PCR) disajikan dalam Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Larutan untuk reaksi PCR 16S rDNA bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1)

No.	Larutan	Volume (μ l)	Konsentrasi
1	2x PCR <i>master mix</i> (Fermentas)	10	
2	<i>Primer</i> P0(27f)	1	10 pmol/ μ l
3	<i>Primer</i> P6 (1495r)	1	10 pmol/ μ l
4	DNA <i>template</i>	1	1 pmol/ μ l
5	Akuabides bebas nuklease	7	

Suspensi 2X PCR *master mix* merupakan produk Fermentas yang berisi 2 x 1,25 ml larutan 2X PCR *master mix* dan 2 x 1,25 ml air bebas nuclease. Komposisi senyawa penyusun 2X PCR *master mix* disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi 2X PCR *master mix*

No.	Senyawa	Konsentrasi akhir
1	Taq DNA Polymerase dalam buffer	0,05 unit/ μ l
2	MgCl ₂	4 mM
3	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Masing-masing 0,4 mM

Sampel dalam *thin tube* tersebut dicampur dengan cara disentrifugasi pada 9800 x g, pada suhu 4°C, selama 20 detik. Tabung-tabung PCR yang berisi sampel

tersebut ditempatkan dalam *Gene Cycler Biorad*. Program untuk amplifikasi 16S rDNA disajikan dalam Tabel 5. Amplikon hasil PCR disimpan pada suhu 4°C.

Tabel 5. Program reaksi PCR untuk amplifikasi 16S rDNA *Acinetobacter* sp. P2(1)

No.	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu (menit)
1	Denaturasi awal	95	2,0
2	35 siklus : Denaturasi	95	0,5
	<i>Annealing</i>	55	1,0
	Ekstensi	72	1,5
3	Ekstensi akhir	72	10,0
4	Ekstensi akhir	37	5,0

Purifikasi amplikon 16S rDNA. Sampel 16S rDNA bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1) hasil PCR dimurnikan menurut metode Gel Extraction Protocol menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* (Geneaid, Taiwan). Tahap pertama, gel agarosa dibuat dengan konsentrasi satu persen yang mengandung 0,1 µg *SyBr save* sebagai pengganti *ethidium bromide*. Sampel 16S rDNA sebanyak 15 µl dicampur dengan loading dye kemudian dimasukkan ke dalam setiap sumur gel dan dielektroforesis dengan *buffer* 1 x TAE pada 100 mV selama 15 menit. Tahap kedua, gel agarosa yang mengandung pita 16S rDNA dipotong dan gel yang berlebihan dibuang untuk meminimalkan ukuran potongan gel. Potongan gel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependorf volume 1,5 ml, selanjutnya ditambahkan 500 µl *buffer* DF ke dalamnya dan dicampur menggunakan *Vortex mixer*. Sampel tersebut diinkubasi pada suhu 66°C sampai potongan gel larut sempurna, selama inkubasi setiap 2-3 menit tabung dibalik-balik. Setelah gel larut, suspensi sampel dibiarkan mendingin dalam suhu ruang. Tahap ketiga, sebuah kolom DF ditempatkan ke dalam tabung koleksi volume dua mililiter. Suspensi sampel 16S rDNA dituangkan ke dalam kolom DF kemudian disentrifugasi pada 16000 x g, 4°C selama 30 detik. Supernatan dibuang kemudian kolom ditempatkan kembali dalam

tabung koleksi. Tahap keempat, *wash buffer* 600 μ l dimasukkan ke dalam kolom DF kemudian disentrifugasi pada 16000 x g, 4°C selama 30 detik. Supernatan dibuang dan kolom ditempatkan kembali dalam tabung koleksi kemudian disentrifugasi lagi pada 16000 x g selama tiga menit untuk mengeringkan membran kolom DF. Tahap kelima, kolom DF dipindahkan ke dalam tabung yang baru kemudian dimasukkan 30 μ l *elution buffer* (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, suhu 25°C) secara langsung ke bagian tengah membran kolom DF, serta dihindarkan *buffer* menempel pada dinding kolom. *Elution buffer* dibiarkan selama 2 menit sampai terserap ke dalam membran kolom DF, kemudian disentrifugasi pada 16000 x g selama satu menit untuk mengelusi 16S rDNA yang sudah murni.

Setiap amplicon gen 16S rDNA murni sebanyak 15 μ l kemudian ditambahkan 2 μ l buffer enzim restriksi, 2,5 μ l akuabides bebas nuclease, serta 0,5 μ l masing-masing enzim restriksi yaitu *Rsa*I, atau *Hin*FI (Roche) dengan konsentrasi 1 μ g/ μ l. Setiap campuran enzim restriksi tersebut selanjutnya diinkubasikan selama 2,5 jam pada suhu 37°C dalam penangas air. Restriksi DNA tersebut dihentikan dengan penambahan 5 μ l *loading dye* (*blue juice*) dan dipanaskan pada 65°C selama 5 menit dalam penangas air. Pola fragmen restriksi gen 16S rDNA sampel 3 μ l dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 2,0% (w/v) pada 50 volt selama 30 menit dalam 2x *buffer* Tris Borat TBE yang mengandung 0,5 μ g ethidium bromida. DNA *ladder* 100 bp (N3231S dari Biolabs) dengan berat molekul antara 100-1517 bp disertakan dalam elektroforesis sebagai *marker* berat molekul, sehingga berat molekul fragmen restriksi dapat ditentukan secara akurat. Pola pita fragmen 16S rDNA pada gel agarosa diamati dengan UV illuminator (Hoefer Macrovue-20) kemudian difoto dengan kamera. Gambar pola pita fragmen 16S rDNA kemudian dikonversikan menjadi diagram representatif dengan program *Photoshop* 9.0.

masing-masing pita fragmen DNA pada diagram representatif diukur jarak pergerakannya.

Analisis regresi antara berat molekul setiap pita fragmen DNA (sumbu X) dengan jarak pergerakannya dari DNA 100 bp *ladder* (sumbu Y) pada gel agarosa hasil elektroforesis dianalisis statistik untuk menentukan persamaan regresinya. Persamaan regresi tersebut digunakan untuk menghitung berat molekul setiap pita fragmen 16S rDNA hasil restriksi pada bakteri uji. Pita fragmen 16S rDNA yang telah diukur jarak pergerakannya, kemudian dihitung berat molekulnya dengan menggunakan persamaan regresi tersebut. Profil fragmen 16S rDNA hasil restriksi digunakan untuk mengidentifikasi strain uji dengan membandingkan pada strain acuan.

Sekuensing 16S rDNA. Analisis 16S rDNA strain uji dilakukan menurut metode Bhattacharya *et al.* (2003, dalam Suharjono, 2008). Amplikon 16S rDNA murni disekuensing dengan menggunakan Bigdye V.3.1. Suspensi campuran untuk setiap tabung pada reaksi PCR tersebut hanya menggunakan satu primer seperti yang tercantum dalam Tabel 7.

Tabel 6. Larutan yang digunakan untuk reaksi PCR sekuensing 16S rDNA

No	Larutan	Volume (μ l)	Konsentrasi
1	<i>Bigdye V.3.1</i>	4	
2	<i>Buffer</i>	4	5x
3	<i>Primer</i>	4	1,6 pmol/ μ l
4	<i>DNA template</i>	8	1 μ g/ μ l

Campuran suspensi tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR 0,2 ml. *Primer* yang digunakan dalam reaksi PCR untuk sekuensing dicantumkan dalam Tabel 7. Suspensi tersebut disentrifugasi pada 10 rpm, 4°C selama 15 detik.

kemudian dimasukkan ke dalam *Thermocycler*. Thermal cycler diatur programnya seperti yang tercantum pada Tabel 8.

Tabel 7. Primer yang digunakan untuk reaksi PCR sekuensing 16S rDNA

No	Primer	Sumber
1	P0 (27f: 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3')	Roche
2	P4A (651f: 5'-AATTACTGGGCGTAAAG-3')	
3	P4 (651r: 5'-CTTTACGCCAGTAATT-3')	
4	P3B (765r: 5'-CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC-3')	
5	P5 (930f: 5'-AAGGAATTGACGGGGGC-3')	
6	P6 (1495r: 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3')	

Tabel 8. Program reaksi PCR untuk sekuensing 16S rDNA bakteri *Acinetobacter* sp. P2(1)

No	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu
1	Denaturasi awal	96	2 menit
2	25 siklus : Denaturasi	96	5 detik
	Annealing	55	1 menit
	Ekstensi	60	4 menit

Suspensi 16S rDNA hasil reaksi sekuensing dipurifikasi dengan metode presipitasi etanol (Ausubel *et al.*, 1997 dalam Suharjono, 2008). Sekuensing 16S rDNA murni bakteri uji akan dilakukan di Laboratorium Proteomik, *Institute of Tropical Disease*, Universitas Airlangga. Suspensi sampel produk PCR *Cycle Seq* yang sudah murni dimasukkan ke dalam mesin sekuensing.

Tahun kedua

4.6. Pemurnian ekstrak kasar biosurfaktan

4.6.1. Pemurnian dengan kromatografi kolom penukar ion

Pemurnian lebih lanjut senyawa aktif permukaan yang telah di dialisis dengan cara melewatkan pada kolom berisi matriks penukar ion DEAE-selulosa (dietil aminoetil selulosa).

4.6.2. Kromatografi cair kinerja tinggi

Identifikasi senyawa aktif permukaan dengan analisa kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT/HPLC) fasa balik dengan menggunakan kolom C-8 dan C-18.

4.7. Analisis spektroskopi senyawa biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1)

4.7.1. Spektroskopi UV-Vis.

Senyawa hasil isolasi sebanyak 0,1 miligram dilarutkan dalam metanol sampai volume 10 mL. Kemudian diukur panjang gelombang maksimum spektrofotometer UV-Vis (Harbone and Peck, 1987).

4.7.2. Spektroskopi inframerah

Sampel sebanyak 1 miligram dicampur dengan 10-100 mg KBr dalam kondisi tanpa air dan dibuat pelet dengan menggunakan cetakan. Pelet KBr tersebut diukur vibrasinya dan dilihat hasil spektrumnya pada panjang gelombang 4000-667 cm^{-1} (Harbone, 1987).

4.7.3. Spektroskopi massa

Biosurfaktan yang telah dimurnikan selanjutnya dianalisis dengan spectrometer GC-MS untuk analisa bagian hidrofob

Tahun ketiga

4.7. Identifikasi gen penyandi produksi biosurfaktan

4.7.1. Amplifikasi gen penyandi.

Deteksi gen pengkode biosurfaktan dilakukan dengan menggunakan PCR. Seperangkat primer digunakan untuk mendeteksi gen tersebut (Tabel 9) (Kozłowska & Kaplan 2007). Kondisi reaksi yang digunakan dalam reaksi PCR ialah 95°C selama 2 menit untuk 35 siklus; 55°C selama 15 detik untuk 35 siklus; 68°C selama 1 menit/1 kb DNA; dan 95°C selama 15 detik untuk 1 siklus.

Tabel 9. Primer yang digunakan dalam penelitian

Primer	Urutan Basa
NKwzc1F	GCG CAT GTG CAT CGC GGA AAC CAG TAA
NKwzc2R	†GTC CGT AGT CCA ATG GCC GAA
F1	CGG GTA CCG AGA TGT CCC GAT ATG
Wzc F	GCT CGA GTT AGT CTT CTT TAT TGG C
WzcR	CGG ATC CTG ACC CAT ACC AAC ACG
MUT F	GCC ACG ACG CAT ATC TGC ATC GAT CAG AAG
MUT R	CCC TCC ATC TCG ATC TAG AGA TTG CAA GCG
F2	CAT GCC TTG ATC TCG CAT TGG
R2	GGT GAA ATA GGC CTA CTA GG

4.7.2. Isolasi dan pemurnian pita gen pengkode biosurfaktan dari gel agarosa.

Pita gen pengkode biosurfaktan diisolasi dan dimurnikan dari gel agarosa dengan menggunakan kit pengekstraksi gel agarosa (Wizard[®]SV Gel-Promega).

4.7.3. Sekuensing dan analisis DNA gen pengkode biosurfaktan.

Pemurnian DNA sebagai persiapan sekuensing dilakukan dengan menggunakan kit dari *AGENCOURT[®] CLEANSEQ[®] Dye-Terminator Removal* (Beckman Coulter-USA). Urutan sekuen gen pengkode dianalisis dengan menggunakan mesin otomatis DNA sekuen Pharmasia tipe ABI 310. Informasi urutan basa dari hasil kloning gen pengkode biosurfaktan dilacak keserupaannya dari data base GeneBank/DDBJ/EMBL menggunakan program BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

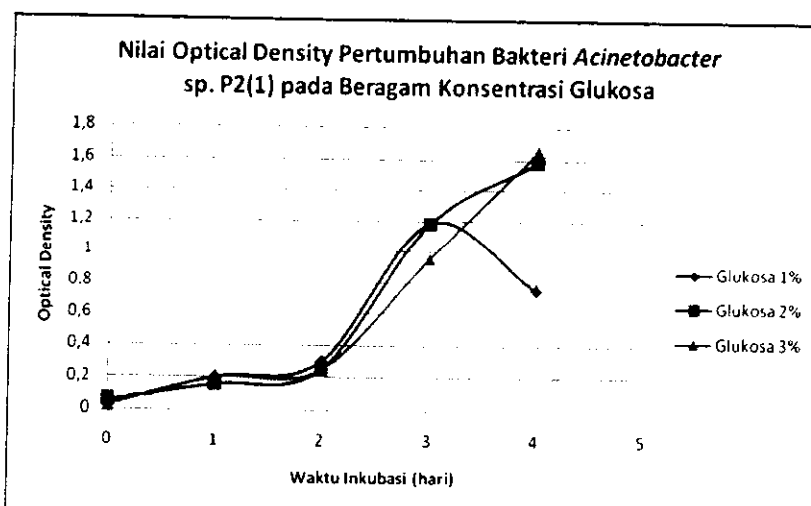
Data penelitian yang telah diperoleh adalah berupa:

- 1) Respon pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada medium dengan berbagai konsentrasi glukosa (0%, 1%, 2%, dan 3%) yang diinkubasi selama 0, 1, 2, 3, dan 4 hari dalam bentuk kurva pertumbuhan.
- 2) Produksi biosurfaktan pada berbagai konsentrasi glukosa yang diukur berdasarkan parameter nilai tegangan permukaan supernatan kultur dan nilai aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap kerosin dan solar.
- 3) Perolehan ekstrak kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1)
- 4) Karakteristik ekstrak kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1)
- 5) Hasil identifikasi isolat secara molekular menggunakan 16SrDNA

Adapun uraian dari masing-masing data disajikan secara berurutan dan dibahas sebagai berikut:

5.1. Respon pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1)

Pada penelitian ini, metode yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan sel adalah menggunakan metode kerapatan optik (*Optical Density/OD*) dan metode penghitungan lempeng total (*Total Plate Count/TPC*). *Acinetobacter* sp. P2(1) ditumbuhkan pada medium mineral sintetik (*Minimal Salt Medium*) yang ditambahkan glukosa dengan konsentrasi yang berbeda-beda (1%, 2%, dan 3%) serta waktu inkubasi yang berbeda (1, 2, 3, dan 4 hari). Respon pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada berbagai kondisi tersebut ditunjukkan dengan kurva pertumbuhan (Gambar 5 dan 6) serta perubahan pH kultur (Gambar 7).

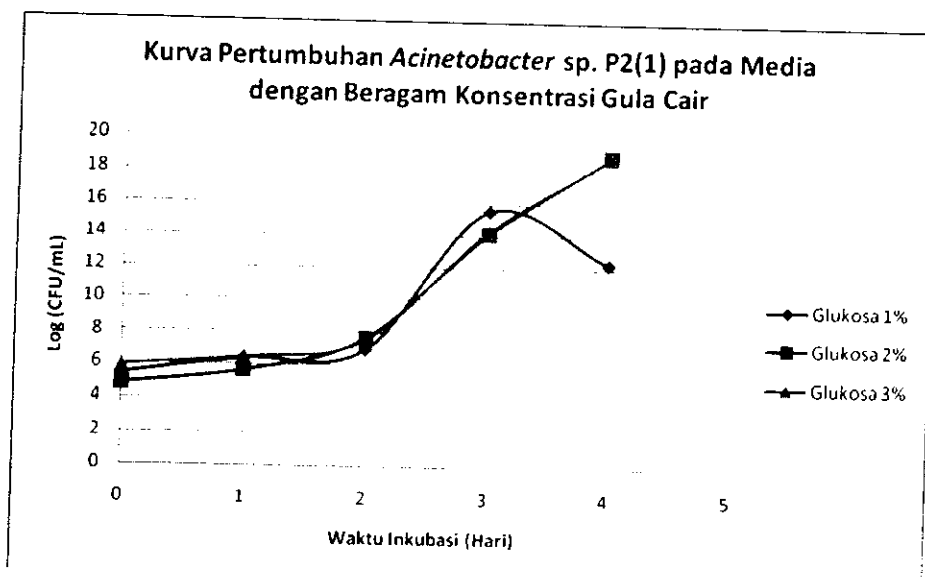


Gambar 5. Kurva pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada berbagai konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi (metode OD)

Gambar 5 menunjukkan bahwa *Acinetobacter* sp. P2(1) selama ditumbuhkan pada medium dengan kandungan glukosa dan waktu inkubasi yang berbeda menunjukkan pola pertumbuhan yang relatif sama, hanya saja waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan fase eksponensial berbeda-beda. *Acinetobacter* sp. P2(1) pada kultur glukosa 1% telah mencapai fase stasioner dan kematian pada hari ke-3, sementara pada kultur glukosa 2 dan 3% masih mencapai fase eksponensial. Hal ini dapat dipahami karena pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi memungkinkan bakteri berkembang biak sebab jumlah nutrisi yang tersedia masih cukup untuk pertumbuhannya. Gambar 1 dan 2 menunjukkan bahwa biomassa tertinggi dicapai pada waktu inkubasi empat hari pada kultur glukosa 2% dan 3% (berturut-turut 18,93 dan 18,86 CFU/mL). Jumlah pertumbuhan yang paling rendah terlihat pada konsentrasi glukosa 1%. Pada konsentrasi ini, titik pertumbuhan tertinggi hanya mencapai 15,53 CFU/mL.

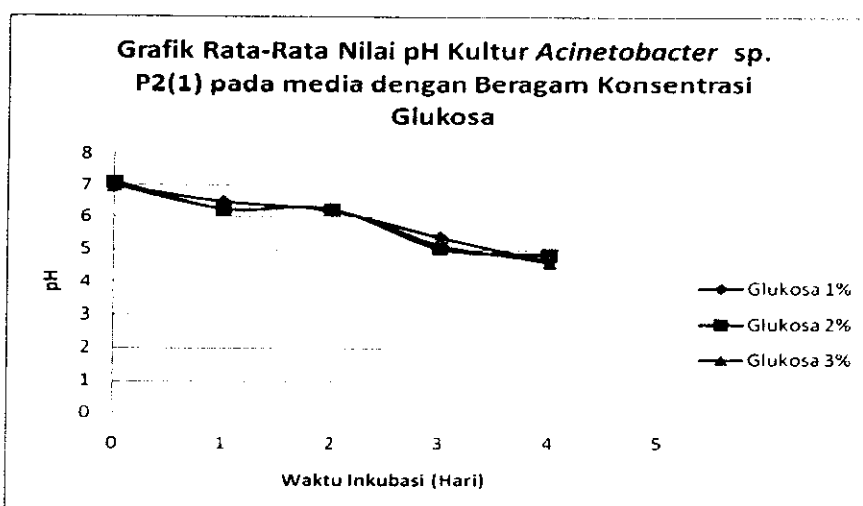
Kurva pertumbuhan dapat digunakan untuk mengetahui korelasi antara fase-fase pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan biosurfaktan yang dihasilkan di masing-masing fase tersebut. Desai dan Banat (1997) melaporkan bahwa akumulasi

produk biosurfaktan *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 terjadi selama fase eksponensial. Sementara Jagtap *et. al.*, (2010) menyatakan bahwa pada *Acinetobacter lwoffii* TA38 penumpukan hasil produksi terjadi pada pertengahan fase stasioner. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan antara fase pertumbuhan dan produksi biosurfaktan berbeda-beda pada masing-masing spesies.



Gambar 6. Kurva pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada berbagai konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi (metode TPC)

Pengamatan pH kultur selama pertumbuhan menjadi hal yang sangat penting dan tidak dapat dipisahkan dari pengamatan mengenai respon pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini, pH awal kultur diatur mencapai nilai 7. Perubahan nilai pH kultur selama waktu inkubasi ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Grafik rata-rata nilai pH kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) selama pertumbuhan pada berbagai konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi

Grafik penurunan pH ketiga kultur menunjukkan pola yang sama. Penurunan nilai pH berbanding terbalik dengan waktu inkubasi. Semakin lama waktu inkubasi, nilai pH cenderung turun hingga mencapai kisaran 4,6-4,85. Penurunan nilai pH selama masa pertumbuhan bakteri dapat disebabkan oleh keberadaan senyawa asam atau basa yang dihasilkan dalam proses metabolisme sel (Pelczar dan Chan, 2006). Menurut Pratiwi (2008), pH merupakan indikasi konsentrasi ion hidrogen. Peningkatan dan penurunan konsentrasi ion hidrogen dapat menyebabkan ionisasi gugus-gugus dalam protein yang mengganggu pertumbuhan sel. Meskipun demikian, penurunan pH yang terjadi selama masa pertumbuhan *Acinetobacter* sp. P2(1) ini, tidak sampai menghambat pertumbuhannya. Hal ini berarti *Acinetobacter* sp. P2(1) toleran terhadap pH asam.

5.2. Produksi Biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada berbagai konsentrasi glukosa

Parameter utama yang umum digunakan untuk mengukur ada tidaknya produksi biosurfaktan adalah nilai tegangan permukaan dan nilai persentase aktivitas emulsifikasi terhadap hidrokarbon (minyak uji, dalam penelitian ini kerosin dan

solar). Tabel 10, 11, dan 12 berikut ini menunjukkan rata-rata penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur dengan konsentrasi glukosa 1, 2, dan 3%.

Tabel 10. Rata-rata penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) dalam substrat glukosa 1%

Waktu Inkubasi (Hari)	Rata-Rata Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)	Rata-Rata Penurunan Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)
0	59,40	0,00
1	55,42	3,98
2	54,23	5,17
3	39,80	19,60
4	43,30	16,10

Penurunan nilai tegangan permukaan dari yang terbesar hingga terkecil berturut-turut ditunjukkan oleh supernatan kultur dengan konsentrasi glukosa 2% inkubasi 3 hari (25,34 mN/m), 2% inkubasi 4 hari (19,66 mN/m), 3% inkubasi 4 hari (19,65 mN/m), dan 1% inkubasi 3 hari (19,60 mN/m).

Tabel 11. Rata-rata penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) dalam substrat glukosa 2%

Waktu Inkubasi (Hari)	Rata-Rata Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)	Rata-Rata Penurunan Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)
0	61,58	0,00
1	50,92	10,66
2	50,92	10,66
3	36,24	25,34
4	41,92	19,66

Tabel 12. Rata-rata penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) dalam substrat glukosa 3%

Waktu Inkubasi (Hari)	Rata-Rata Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)	Rata-Rata Penurunan Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)
0	59,45	0,00
1	60,16	-0,17
2	50,45	9,00
3	46,19	13,26
4	39,80	19,65

Tabel 13, 14, dan 15 menunjukkan nilai rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) terhadap hidrokarbon atau minyak uji (%) solar dan kerosin. Aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh kultur glukosa 3% inkubasi 4 hari (63,20% pada solar dan 61,22% pada kerosin), kemudian diikuti kultur glukosa 2% inkubasi 4 hari (57,11% pada solar dan 52,02% pada kerosin), dan kultur glukosa 1% inkubasi 3 hari (15,22 pada solar dan 29,88 pada kerosin). Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak solar divisualisasikan dalam Gambar 8.

Hasil pengukuran tegangan permukaan dan aktivitas emulsifikasi dijadikan acuan untuk menentukan kultur yang akan diproduksi dan dilanjutkan dengan ekstraksi produk kasar biosurfaktan dengan metode presipitasi menggunakan ammonium sulfat. Kultur glukosa 3% dengan waktu inkubasi 4 hari diputuskan untuk diproduksi dan diekstraksi karena menunjukkan dua parameter produksi biosurfaktan sekaligus (tegangan permukaan supernatan turun lebih dari 10 mN/m, yaitu 19,65 mN/m dan aktivitas emulsifikasinya tertinggi yaitu 63,20 pada solar dan 61,22 pada kerosin). Nilai tegangan permukaan dan nilai aktivitas emulsifikasi juga akan diperkuat dengan perolehan massa produk kasar biosurfaktan.

Tabel 13. Aktivitas emulsifikasi (AE) supernatan kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) menggunakan glukosa 1%

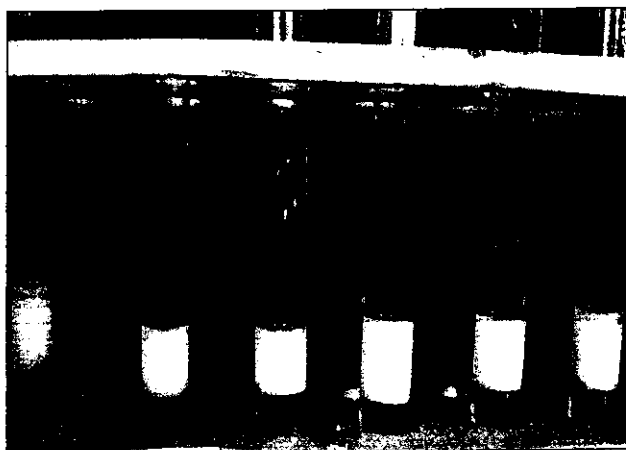
Waktu inkubasi (Hari)	AE 1 jam (%)		AE 24 jam (%)	
	Solar	Kerosin	Solar	Kerosin
0	0	6,11	0	0
1	0	25,13	0	22,01
2	0	42,17	0	39,01
3	19,12	32,17	15,22	29,88
4	0	32,03	0	30,55

Tabel 14. Aktivitas emulsifikasi (AE) supernatan kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) menggunakan glukosa 2%

Waktu inkubasi (Hari)	AE 1 jam (%)		AE 24 jam (%)	
	Solar	Kerosin	Solar	Kerosin
0	0	5,12	0	0
1	2,53	32,03	0	30,11
2	15,78	45,57	10,17	44,31
3	25,11	47,15	23,53	45,71
4	59,88	53,09	57,11	52,02

Tabel 15. Aktivitas emulsifikasi (AE) supernatan kultur *Acinetobacter* sp. P2(1) menggunakan glukosa 3%

Waktu inkubasi (Hari)	AE 1 jam (%)		AE 24 jam (%)	
	Solar	Kerosin	Solar	Kerosin
0	0	7,15	0	5,02
1	20,36	16,56	19,17	15,72
2	25,88	21,21	24,07	19,50
3	45,33	49,28	44,17	47,72
4	64,67	62,19	63,20	61,22

**Gambar 8.** Aktivitas emulsi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) pada solar dengan substrat glukosa 3% dengan waktu inkubasi 4 Hari

5.3. Perolehan ekstrak kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1)

Metode ekstraksi produk kasar biosurfaktan yang umum dipakai untuk genus *Acinetobacter* adalah pengendapan asam, pengendapan ammonium sulfat, pengendapan aseton, dan fraksinasi bertingkat. Dari keempat metode ekstraksi

tersebut, Qur'aini (2011) melaporkan bahwa ekstraksi biosurfaktan dengan menggunakan ammonium sulfat pada *Acinetobacter* sp. P2(1) memberikan hasil optimum dibandingkan metode lainnya. Selain itu, Bach *et al.*, (2003) juga melaporkan bahwa emulsi yang dihasilkan oleh *Acinetobacter venetianus* RAG-1 diekstraksi menggunakan 60% ammonium sulfat. Hal inilah yang mendasari penggunaan metode ekstraksi dengan ammonium sulfat pada penelitian ini.

Hasil ekstraksi supernatan kultur dengan konsentrasi glukosa 3% dan waktu inkubasi 4 hari menunjukkan perolehan produk kasar sebesar 41,16 g/L (lampiran). Produk kasar selanjutnya dikarakterisasi dengan mengukur nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan, nilai aktivitas emulsifikasi, nilai *Critical Micelle Concentration* (CMC), mengukur kestabilan biosurfaktan terhadap perubahan suhu dan pH.

5.4. Karakteristik ekstrak kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1)

Karakter produk kasar biosurfaktan diperlukan untuk mengetahui efektivitas dan efisiensi penggunaan biosurfaktan untuk aplikasi di bidang industri. Keandalan biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dapat diketahui dari karakteristik nilai kritis membentuk misel (CMC), nilai kritis lepasnya misel (CMD), stabilitas emulsi terhadap hidrokarbon, kisaran pH, dan kisaran suhu.

5.4.1. *Critical Micelle Concentration* (CMC)

Nilai CMC adalah konsentrasi biosurfaktan yang dibutuhkan untuk membentuk misel biosurfaktan. Pengukuran nilai CMC produk kasar biosurfaktan dilakukan dengan penambahan berat kering produk kasar biosurfaktan secara bertingkat sampai membentuk misel yang ditandai dengan kestabilan nilai tegangan permukaan dan tidak mengalami penurunan lagi.

Tabel 16. Pengaruh penambahan konsentrasi produk kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) terhadap nilai tegangan permukaan

Konsentrasi	Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)			Rata-rata
	1	2	3	
0 g/L (Aquadess)	72.00	72.00	72.00	72.00
5.45 g/L	60.71	60.29	62.78	61.26
9.99 g/L	58.64	59.33	60.02	59.33
13.85 g/L	59.88	61.40	60.85	60.71
17.14 g/L	62.09	61.40	61.40	61.63

Tabel 16 di atas menunjukkan bahwa nilai CMC dicapai pada konsentrasi biosurfaktan 9.99 g/L. Hal ini dapat dilihat dari nilai tegangan permukaan aquades yang menurun secara drastis dari 72 mN/m menjadi 59,33 mN/m setelah ditambahkan 9.99 g/L biosurfaktan. Selanjutnya, penambahan biosurfaktan ke dalam larutan aquades tidak menyebabkan penurunan tegangan permukaan secara signifikan. Titik inilah yang disebut sebagai titik kritis biosurfaktan membentuk misel (CMC) yang menyebabkan tegangan permukaan mencapai penurunan yang maksimum.

Tabel 17 dan 18 berikut menampilkan pengaruh suhu terhadap kestabilan biosurfaktan (ditinjau dari parameter nilai tegangan permukaan larutan biosurfaktan). Kestabilan diamati setelah diinkubasi pada suhu 1 jam dan 24 jam, dengan mengukur perubahan tegangan permukaan larutan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) relatif stabil terhadap pemanasan dan tetap bersifat aktif permukaan pada kisaran suhu 20-80°C. Hal ini merupakan nilai positif dalam pengembangan produk biosurfaktan untuk aplikasi industri yang membutuhkan suhu tinggi.

Tabel 17. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan suhu (1 jam)

Suhu	Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)			Rata-rata
	1	2	3	
20	61.30	61.51	61.64	61.48
30	61.02	61.09	60.46	60.86
40	61.58	61.85	61.99	61.81
50	61.23	61.51	61.16	61.30
60	61.99	62.34	62.20	62.18
70	64.15	64.77	64.49	64.47
80	65.19	65.33	65.81	65.44

Tabel 18. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan suhu (24 jam)

Suhu (°C)	Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)			Rata-rata
	1	2	3	
20	61.23	61.30	61.16	61.23
30	61.30	61.30	61.30	61.30
40	61.30	61.30	61.44	61.35
50	61.16	61.44	61.44	61.32
60	62.41	62.69	62.90	62.67
70	63.73	63.80	63.73	63.75
80	64.63	64.70	64.70	64.68

Tabel 19 dan 20 berikut ini menampilkan pengaruh pH larutan terhadap kestabilan biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) (ditinjau dari parameter nilai tegangan permukaan larutan biosurfaktan). Biosurfaktan masih menunjukkan aktivitas permukaan pada larutan dengan kisaran pH 2-12.

Tabel 19. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan pH (1 jam)

pH	Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)			Rata-rata
	1	2	3	
2	57.68	54.21	55.60	55.83
4	58.52	59.07	58.17	58.59
6	51.43	50.80	51.57	51.27
7	59.21	58.86	59.56	59.21
8	55.60	59.07	56.50	57.06
10	50.73	51.64	53.86	52.08
12	55.74	55.25	55.81	55.6

Tabel 20. Stabilitas nilai tegangan permukaan produk kasar biosurfaktan terhadap perubahan pH (24 Jam)

pH	Nilai Tegangan Permukaan (mN/m)			Rata-rata
	1	2	3	
2	58.17	58.59	59.07	58.61
4	59.28	59.77	59.91	59.65
6	52.82	51.64	54.90	53.12
7	60.46	59.35	59.98	59.93
8	53.38	59.49	58.38	58.75
10	54.35	54.83	55.11	54.76
12	56.57	56.99	57.47	56.01

Tabel 21 merupakan hasil pengukuran nilai tegangan permukaan larutan buffer pH yang digunakan untuk mengamati kestabilan produk kasar biosurfaktan pada kisaran pH 2 hingga 12. Tabel 22 disajikan untuk melihat seberapa besar kemampuan biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Acinetobacter* sp. P2(1) dalam menurunkan tegangan permukaan larutan buffer. Pada pH di atas 8 pengaruh biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan mulai berkurang.

Tabel 21. Pengukuran nilai tegangan permukaan larutan buffer pH

pH	Nilai Tegangan Permukaan Buffer (mN/m)			Rata-rata
	1	2	3	
2	69.22	70.12	72.63	70.66
4	63.59	62.90	64.63	63.71
6	60.46	65.68	65.33	63.82
7	64.50	71.58	72.63	69.57
8	66.16	66.65	67.07	66.63
10	57.82	58.73	57.68	58.08
12	59.56	59.91	60.53	60

Tabel 22. Pengukuran nilai tegangan permukaan larutan setelah penambahan biosurfaktan

pH	TP Buffer (mN/m)	TP Buffer+Biosurfaktan (mN/m)	Selisih TP Buffer dengan TP Buffer+Biosurfaktan
2	70.66	58.61	12.05
4	63.71	59.65	4.06
6	63.82	53.12	10.7
7	69.57	59.93	9.64
8	66.63	58.75	7.88
10	58.08	54.76	3.32
12	60	56.01	3.99

5.5. Uji kualitatif komponen kimia

Analisis kimia dilakukan pada produk kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) meliputi uji karbohidrat, protein, fosfat, dan asam lemak. Keberadaan karbohidrat pada produk kasar biosurfaktan diuji menggunakan reagen fehling A dan B. Hasil yang diperoleh yaitu terbentukna endapan berwarna merah bata. Hal ini menunjukkan bahwa produk biosurfaktan mengandung komponen karbohidrat (gula).

Untuk mengetahui keberadaan protein digunakan reagen biuret. Dari uji diketahui bahwa biosurfaktan yang dihasilkan tidak mengandung protein. Melalui

penambahan $Ba(NO_3)_2$ dalam larutan biosurfaktan diketahui bahwa terdapat kandungan fosfat dalam biosurfaktan yang diproduksi oleh *Acinetobacter* sp. P2(1).

Tabel 23 di bawah ini menunjukkan hasil pengujian secara kualitatif komponen kimia ekstrak kasar biosurfaktan.

Tabel 23. Hasil pengamatan uji kualitatif komponen kimia ekstrak kasar biosurfaktan

Uji	Hasil Uji
Fehling	Positif, terbentuk endapan merah bata
Biuret	Negatif, tidak terjadi perubahan warna menjadi ungu
Fosfat	Positif, terbentuk endapan berwarna putih

Untuk mengetahui komponen hidrofobik dari produk kasar biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dilakukan hidrolisis parsial dan esterifikasi, kemudian dianalisis menggunakan GC-MS. Hasil analisis menunjukkan bahwa komponen hidrofobik penyusun biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) adalah asam lemak yang tercantum pada tabel 24 berikut ini. Sementara itu grafik kromatogram dapat dilihat pada lampiran.

Tabel 24. Komponen asam lemak penyusun biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1)

No.	Nama	Komposisi(%)
1.	Asam laurat	3,48
2.	Asam miristat	4,76
3.	Asam palmitoleat	2,81
4.	Asam palmitat	29,79
5.	Asam linoleat	2,37
6.	Asam oleat	10,55
7.	Asam stearat	23,49
8.	Tidak diketahui	2,69

Dari tabel 24 di atas dapat dilihat bahwa komponen asam lemak yang menyusun biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) terdiri atas 8 jenis asam lemak, dengan kandungan terbesar berupa asam palmitat (29,79%) dan asam stearat (23,49%).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Penelitian yang telah dilakukan menghasilkan simpulan sebagai berikut:

1. Konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi optimum untuk produksi biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) adalah glukosa 3% dengan inkubasi 4 hari dengan penurunan nilai Tegangan Permukaan supernatan sebesar 19,65 mN/m, Aktivitas emulsi sebesar 63,20 % pada solar dan 61,22% pada kerosin.
2. Karakteristik biosurfaktan yang dihasilkan *Acinetobacter* sp. P2(1) adalah memiliki nilai CMC sebesar 9,99 g/L, stabil pada pH 2-12, stabil pada suhu 20-50° C.
3. Biosurfaktan yang diproduksi tersusun atas komponen karbohidrat, fosfat, dan asam lemak.

6.2. Saran

Perlu penelitian lanjutan terkait pemurnian produk biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) serta analisis komponen kimia penyusun biosurfaktan secara lebih detail.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Bertrand, J.C, Bonin, P., Goutx, M., Gauthier, M., dan Mille, G. 1997. The Potential Application of Biosurfactant in Combatting Hydrocarbon Pollution in Marine Environment. *Microbiol.* Vol. 145, pp. 53-56.
- Calvo,C.,Toledo,F.2004. Biotechnology of Bioemulsifier Produced by Microorganism. *Journal of Food Agriculture and Environmental.* Vol 2 (3&4) : 238-243.
- Carillo, Francisco.1996. Isolation and Selection Biosurfactant Producing Bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 12.84
- Cooper, D.G. dan Godenberg J.E. 1997. Surface Active Compounds from Microorganisms. **Adv. Appl. Microbiol.** Vol. 26, pp. 229-253.
- Desai, J.D. dan Banat, I.M. 1997. Microbial Production of Surfactant and Commercial Potential. **Microbiol and Molecular Rev.** Vol. 61, pp. 47-64.
- Goutx,M.,Acquaviva,M.Bertrand,J.C.1990.Cellular and Extracellular Carbohydrates and Lipids from Marine Bacteria During Growth on soluble substrate and Hydrocarbon. *Marine Ecology Progress Series* Vol 61: 291-296.
- Inoue H, Nojima H, and Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
- Kim, S.H., Lim, E.J., Lee, S.K., Lee, J.D., dan Lee, T.H. 2000. Purification and Characterization of Biosurfactant from *Nocardia sp.* L-147. **Biotechnol. Appl. Biochem.** Vol. 31, pp. 249-253.
- Kosaric, N. 1993. Biosurfactant, Production, Properties, and Application. **Marcel Dekker INC. New York.** pp. 31-73,329-368.
- Kozlowska HD and Kaplan DL. 2007. Protein Engineering of Wzc To Generate New Emulsan Analogs. *Appl Environ Microbiol* 73(12): 4020-4028.
- Mulligan, C. N. dan Gibbs, B. F. 1993. Biosurfactant. **Appl. Microbial Biotechnol.** pp. 337-347.
- Nakar D and Gutnick DL. 2001. Analysis of the *wee* gene cluster responsible for the biosynthesis of the polymeric bioemulsifier from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. *Microbiology* 147:1937-1946.

- Nakar D and Gutnick DL. 2003. Involvement of a protein tyrosine kinase in production of the polymeric bioemulsifier emulsan from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. *J Bacteriol* 185:1001-1009.
- Ni'matuzahroh, Fatimah, Affandi, M., Supriyanto, A., dan Hidayatul Alami, N. 2009. **Laporan Stranas 2009**. Departemen Biologi Universitas Airlangga. Surabaya.
- Pruthi, A. dan Cameotra, S.S. 1997. Rapid Identification of Biosurfactant Strains Using A Cell Surface Hydrophobicity Technique. **Biotechnol. Technique**. Vol. 11 No. 9.
- Rosenberg E, Bekerman R, Segal G and Ron EZ. 2005. The AlnB protein of the bioemulsan alasan is a peroxiredoxin. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 536–541.
- Sim, L., Ward, O.P. and Li, Z.Y. 1997. Production and Characterization of a Biosurfactant Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19 :232-238
- Toren A, Orr E, Paitan Y, Ron EZ and Rosenberg E. 2002. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpAlike protein. *J Bacteriol* 184:165-170.
- Zosim Z, Rosenberg E and Gutnick DL. 1986. Changes in emulsification specificity of the polymeric bioemulsifier emulsan: effects of alkanols. *Colloid & Polymer Scie* 264, 218-223.
- Van Dyke, M.I, Coute, P. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* V62 Rhamnolipid Bioemulsifier : Structural and Characterization and Their Use in Removing Hydrophobic Compound From Soil. *Canadian Journal Microbiology* 39:1071-1078
- Widodo, 2010. Uji Efektivitas Biosurfaktan Dari *Acinetobacter sp.* P2(1) dan *Pseudomonas putida* t1(8) dalam memobilisasi minyak mentah menggunakan *sand pack column*. **Skripsi**. Universitas Airlangga. Surabaya.

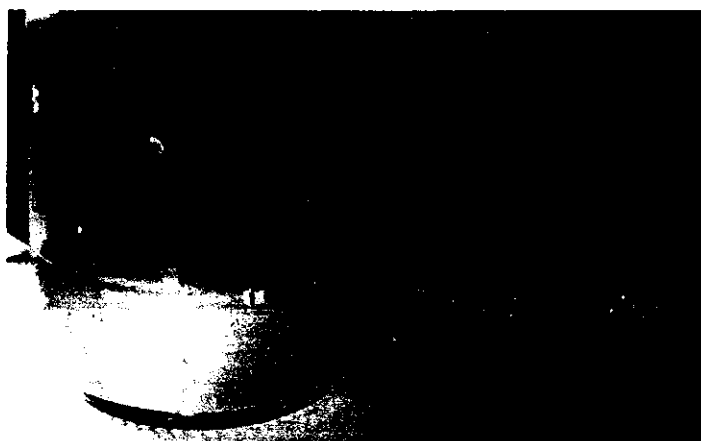
Lampiran



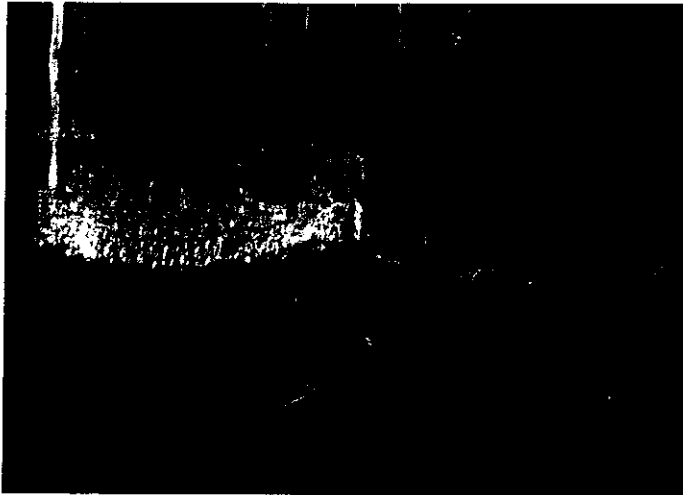
Gambar 1. Kultur biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan substrat glukosa 3% dengan waktu inkubasi 1 hari



Gambar 2. Kultur biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan substrat glukosa 3% dengan waktu inkubasi 2 hari



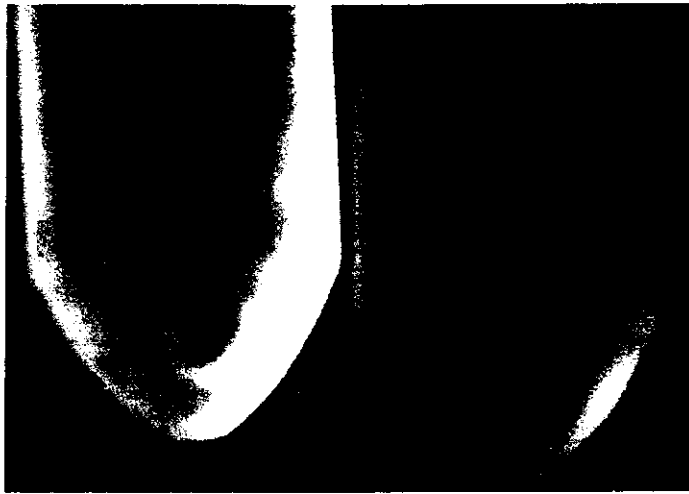
Gambar 3. Kultur Biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan substrat Glukosa 3% dengan Waktu Inkubasi 3 Hari



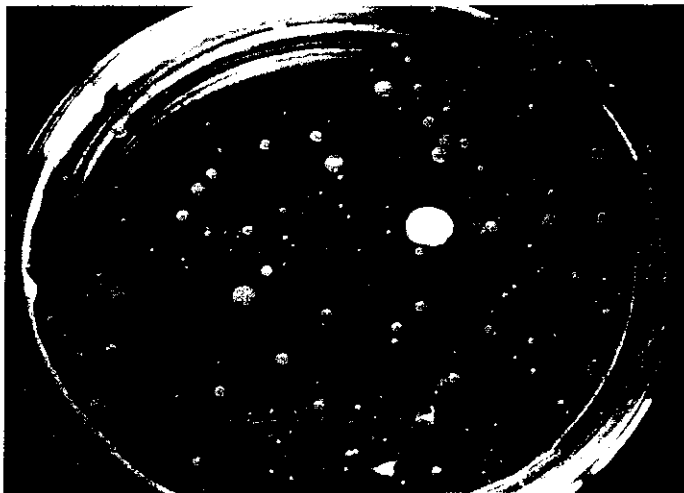
Gambar 4. Kultur biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan substrat glukosa 3% dengan waktu inkubasi 4 hari



Gambar 5. Supernatan kultur biosurfaktan *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan substrat glukosa 3% dengan waktu inkubasi 4 hari



Gambar 6. Biomassa kultur biosurfaktan *Acinetobacter sp. P2(1)*



Gambar 7. Karakteristik koloni *Acinetobacter sp. P2(1)* pada NA

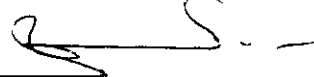
Tabel Kromatogram Komponen Sampel 10-205

No	Waktu Tambat	Nama Komponen	Quality*	% Normalisasi Area
1	2.440	1-tetradekena	99	2.350
✓ 2	3.200	metil ester asam laurat	95	3.480
3	3.750	1-setena	99	6.220
✓ 4	5.210	metil ester asam miristat	98	4.764
5	6.170	1-oktadekena	99	5.458
✓ 6	8.120	metil ester asam palmitoleat	99	2.805
✓ 7	8.500	metil ester asam palmitat	99	29.785
8	9.840	1-dokosena	97	4.030
✓ 9	12.090	metil ester asam linoleat	99	2.365
✓ 10	12.230	metil ester asam oleat	99	10.552
✓ 11	12.830	metil ester asam stearat	99	23.489
12	14.380	sikloeikosan	95	2.016
13	17.320	tidak diketahui (unknown)	35	2.686

* = kesesuaian spektrum sampel dengan spektrum library instrumen (skala 0-100)

Surabaya, 10 Oktober 2012

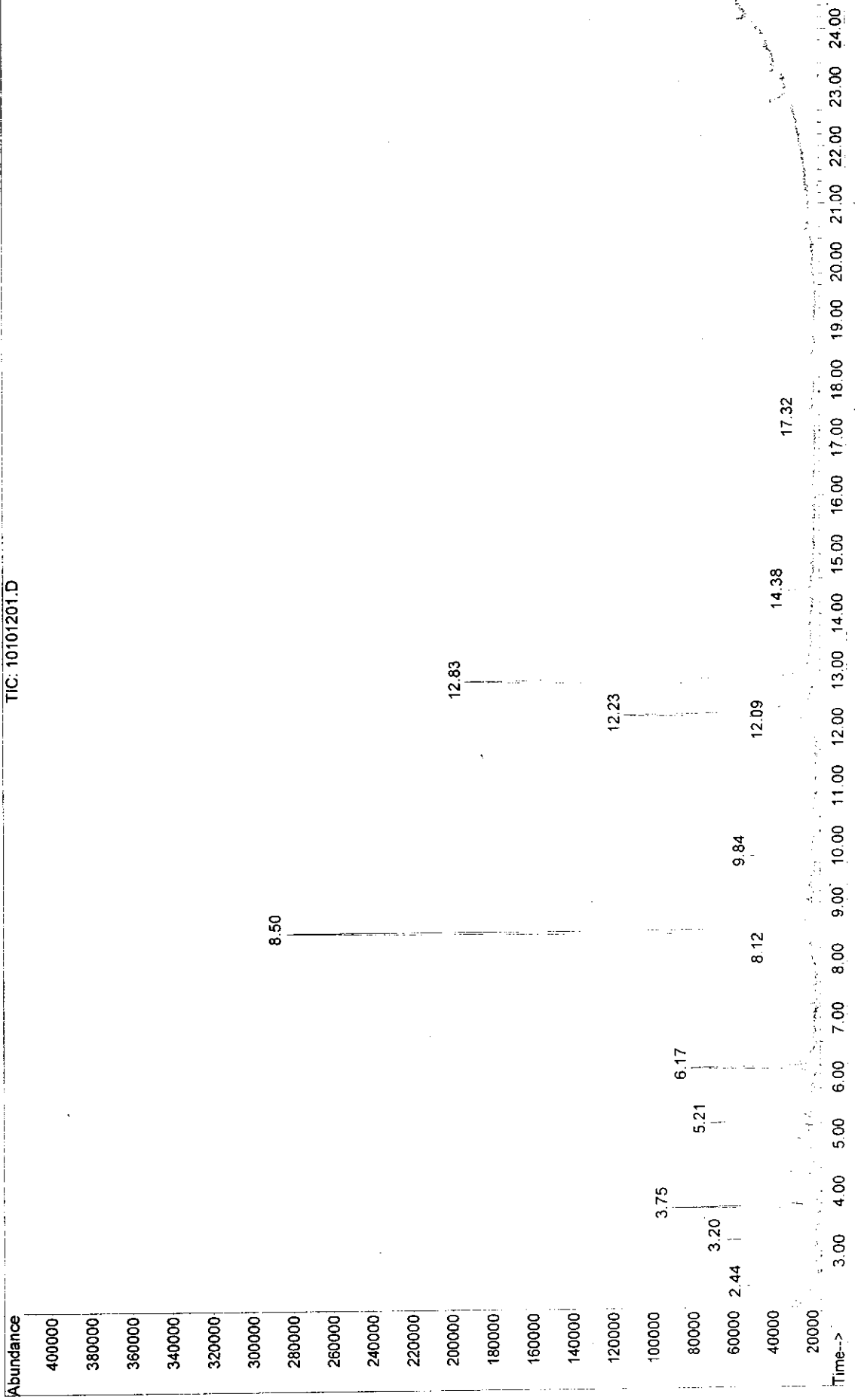
Analisis ULPFFUA



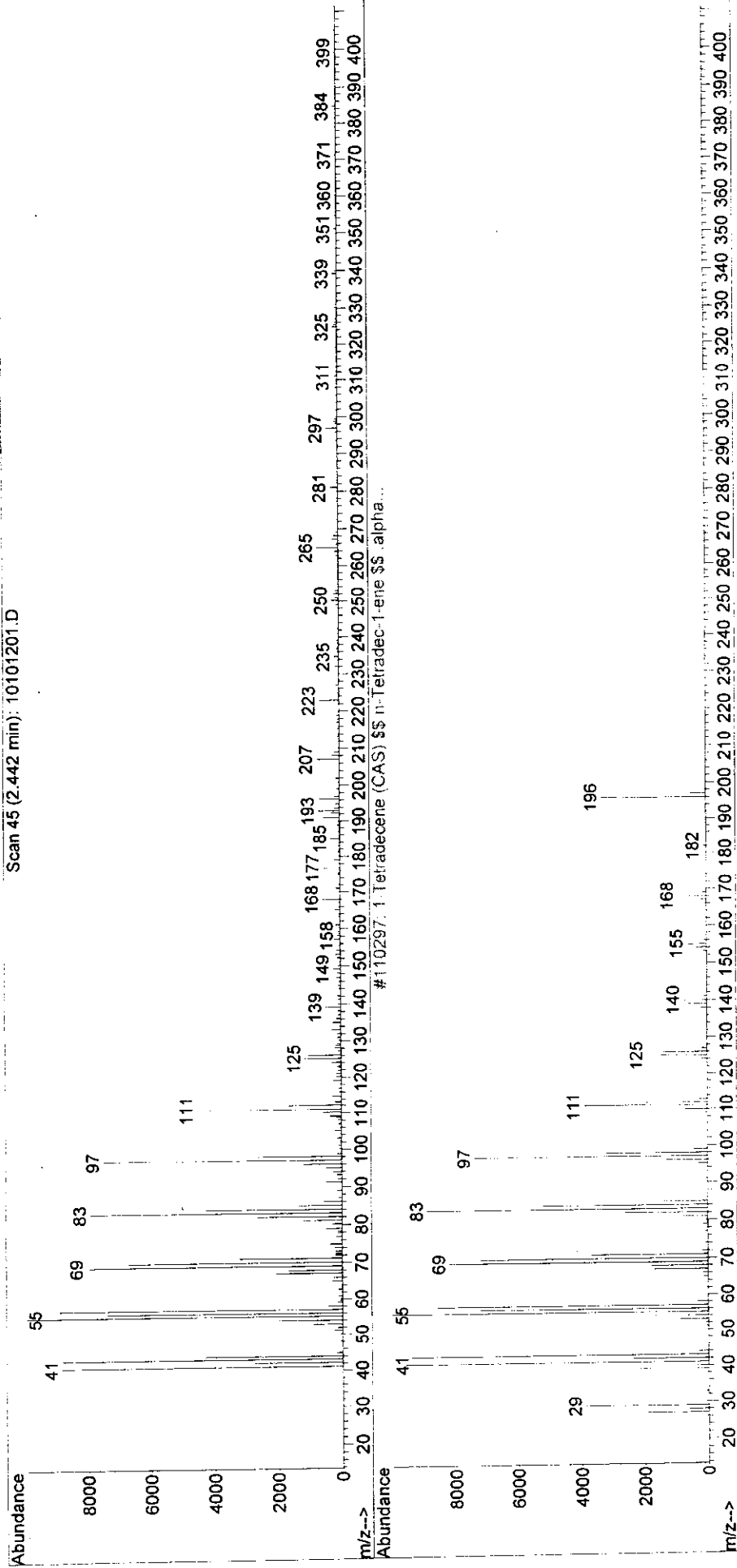
Sri Gunarso, S.Si., Apt

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\FAME\10101201.D
Operator : C001
Acquired : 10 Oct 2012 13:07 using AcqMethod FAMEKAN.M
Instrument : Instrument #1
Sample Name : Sampel 10-205
Misc Info : splitless
Vial Number: 10

TIC: 10101201.D



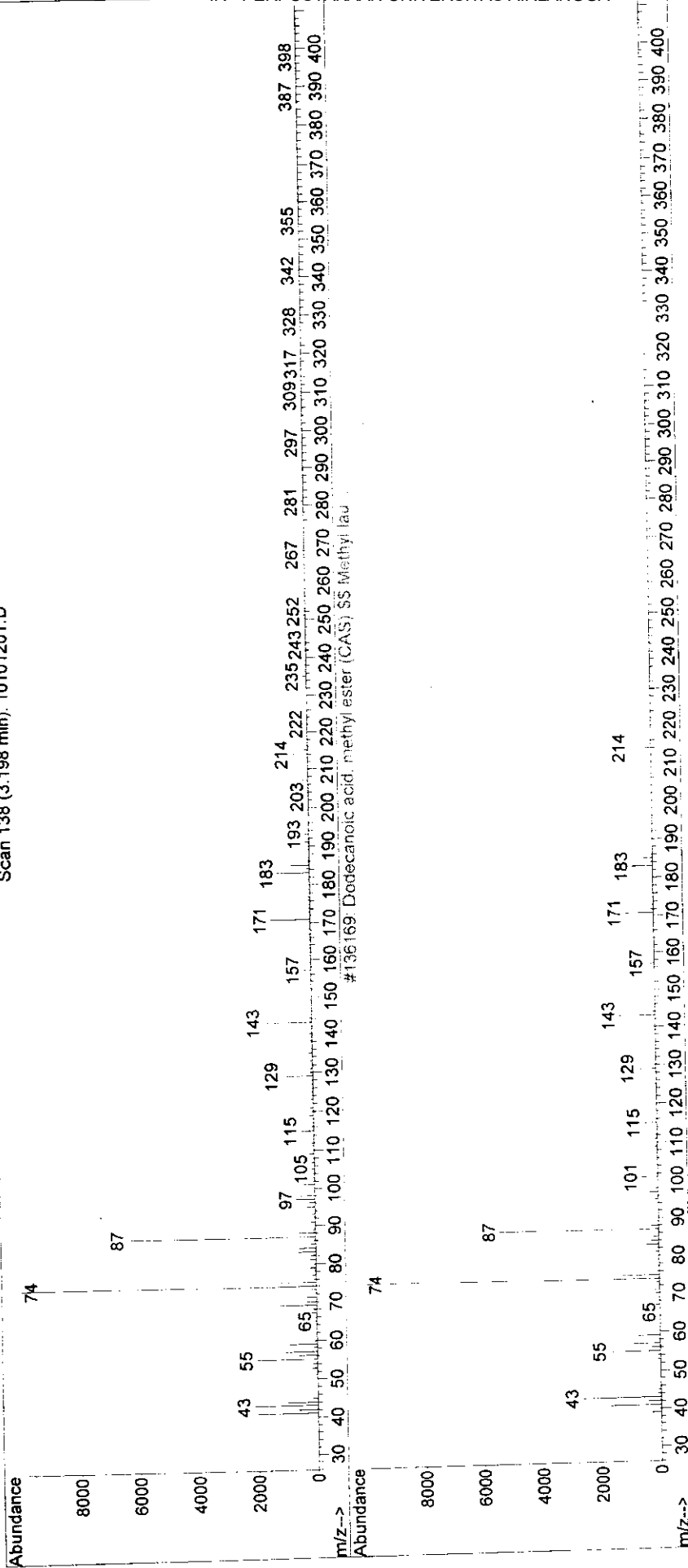
Library Searched : C:\Database\wiley\n.i
Quality : 99
ID : 1-Tetradecene (CAS) \$\$ n-Tetradec-1-ene \$\$.alpha.-Tetradecene \$\$ 1-Butadecene \$\$
Dialene 14



Library Searched : C:\Database\wiley7n.1

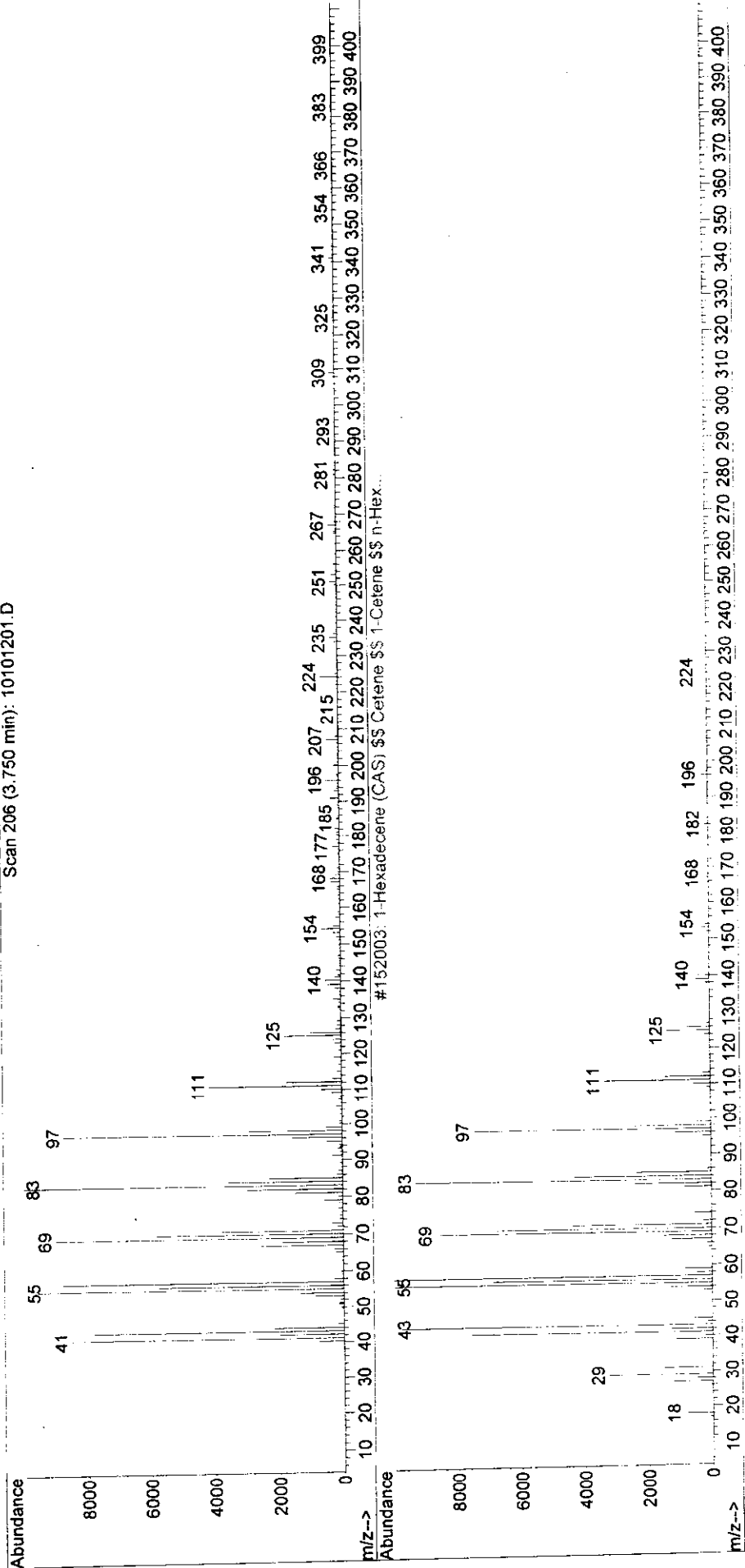
Quality : 95
 ID : Dodecanoic acid, methyl ester (CAS) \$\$ Methyl laurate \$\$ Methyl dodecanoate \$\$ Me
 thyl n-dodecanoate \$\$ Lauric acid methyl ester \$\$ Metholene 2296 \$\$ Methyl laurin
 ate \$\$ Methyl dodecylate \$\$ Uniphat A40 IN 511 \$\$ Lauric acid, methyl ester \$\$ Do
 decanoic aci

Scan 138 (3.198 min): 10101201.D

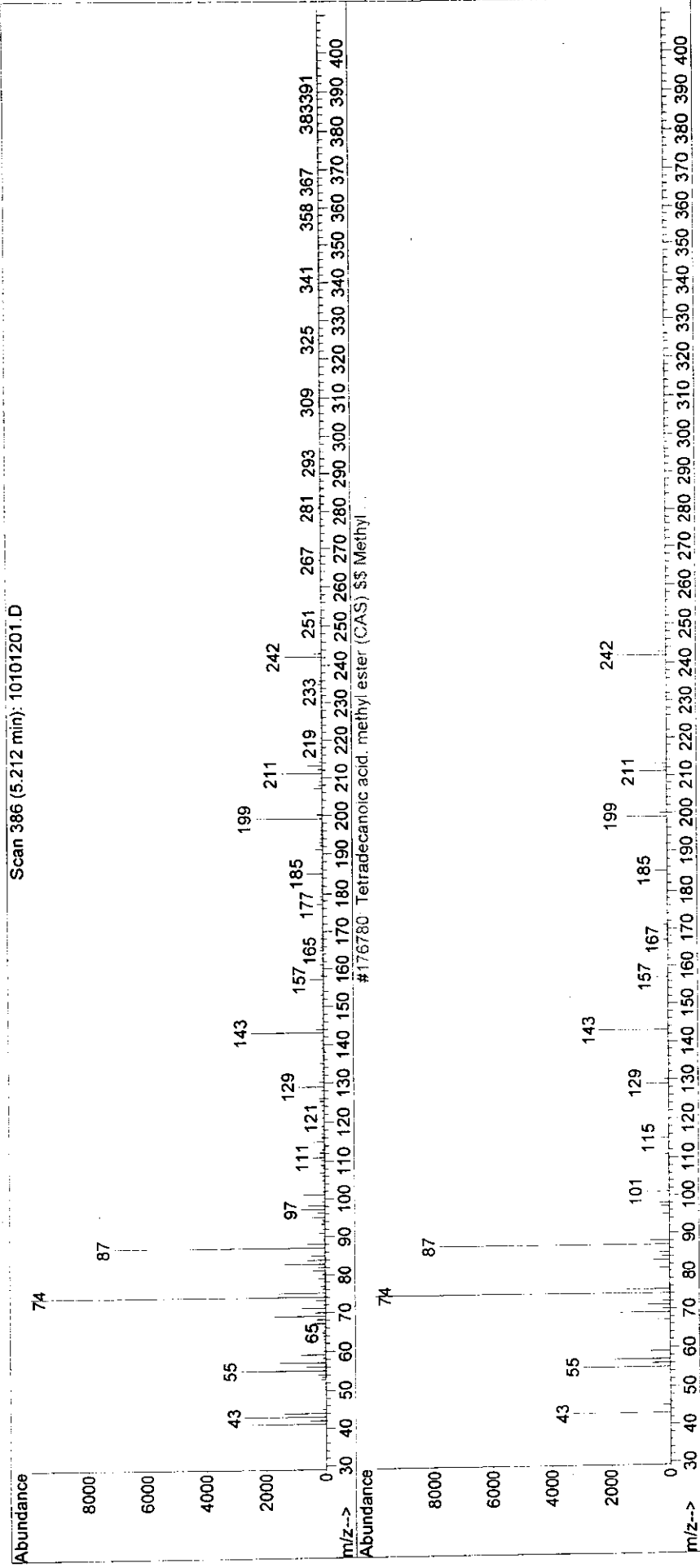


Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
 Quality : 99
 ID : 1-Hexadecene (CAS) \$\$ Cetene \$\$ 1-Cetene \$\$ n-Hexadec-1-ene \$\$.alpha.-Hexadecene
 \$\$ HEXADECENE-1 \$\$ Hexadecylene-1

Scan 206 (3.750 min): 10101201.D

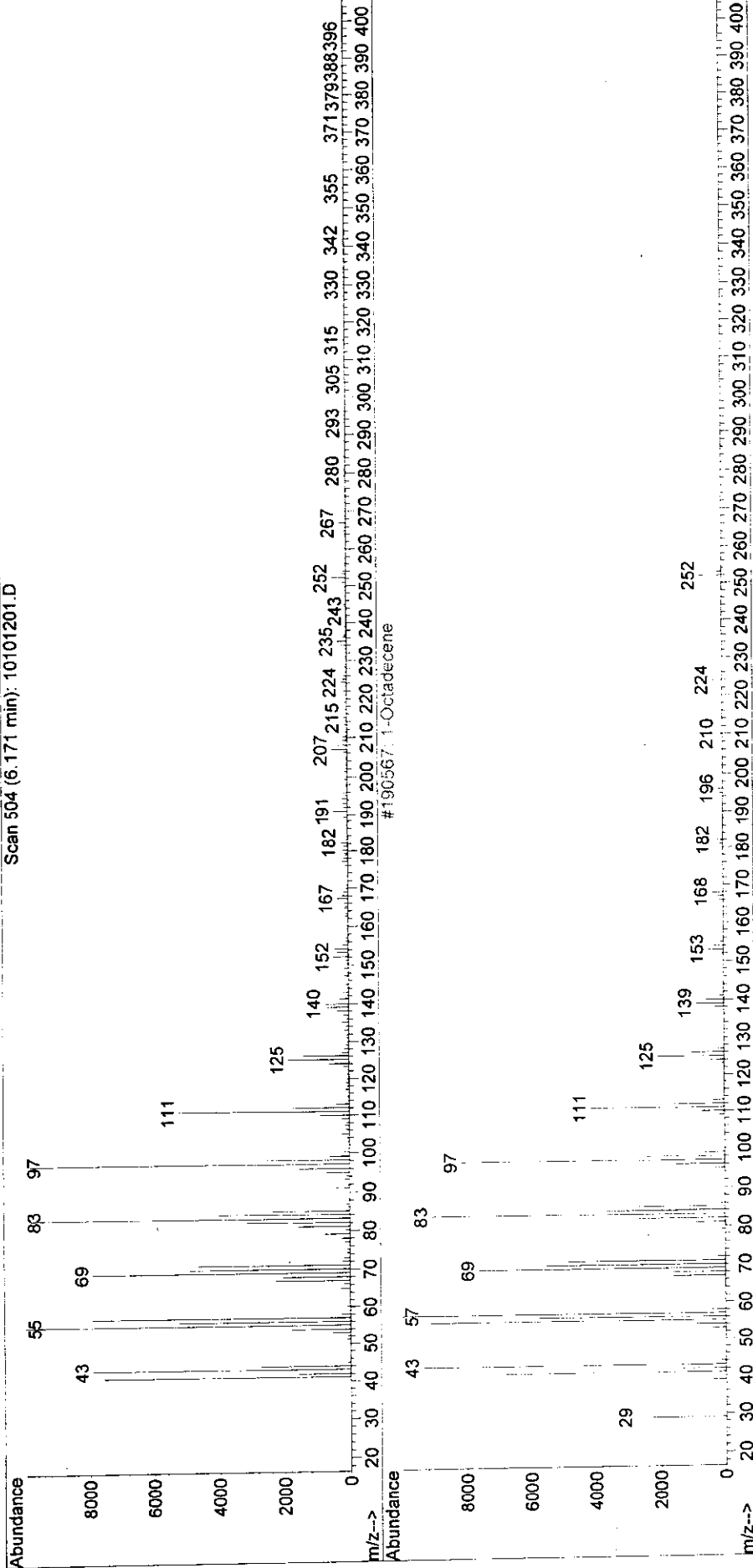


Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
 Quality : 98
 ID : Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) \$\$ Methyl myristate \$\$ Methyl tetradecanoate \$\$ Methyl n-tetradecanoate \$\$ Myristic acid methyl ester \$\$ Uniphath A50 \$\$ Methyl myristate 2495 \$\$ Myristic acid, methyl ester \$\$ Tetradecanoic acid methyl ester \$ MYRISTIC A



Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
Quality : 99
ID : 1-Octadecene

Scan 504 (6.171 min): 10101201.D

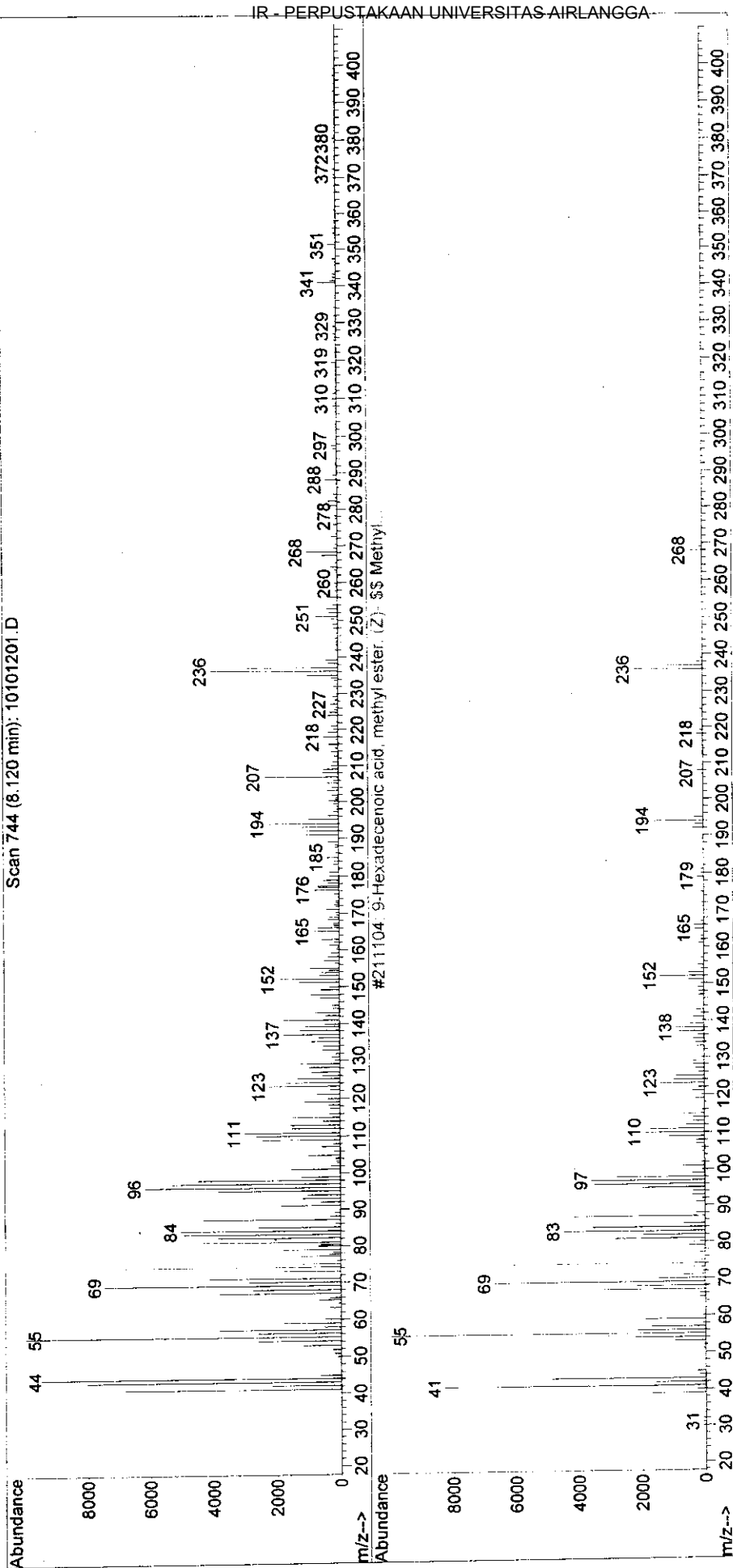


Library Searched : C:\Database\wiley7n.1

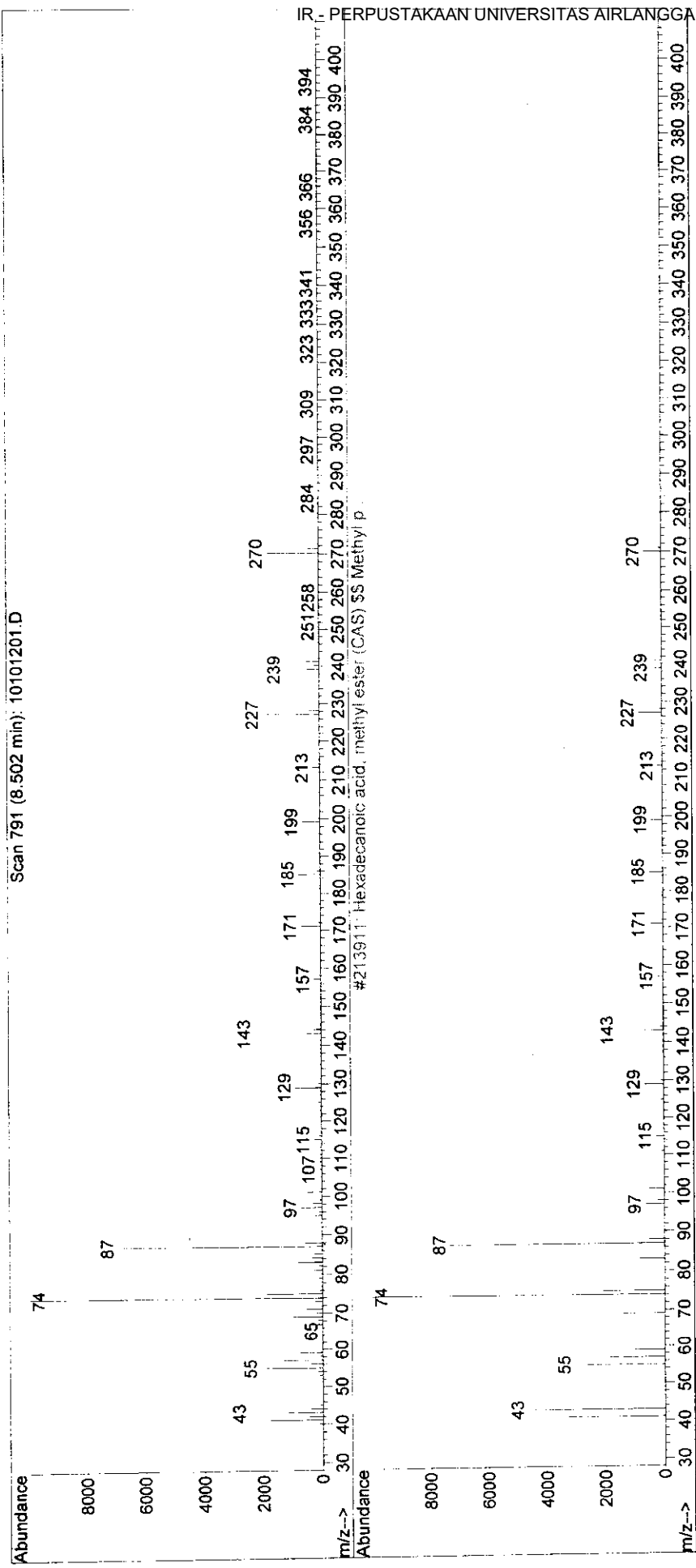
Quality : 99

ID : 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
einate 9-Hexadecenoic acid, methyl ester

Scan 744 (8.120 min): 10101201.D

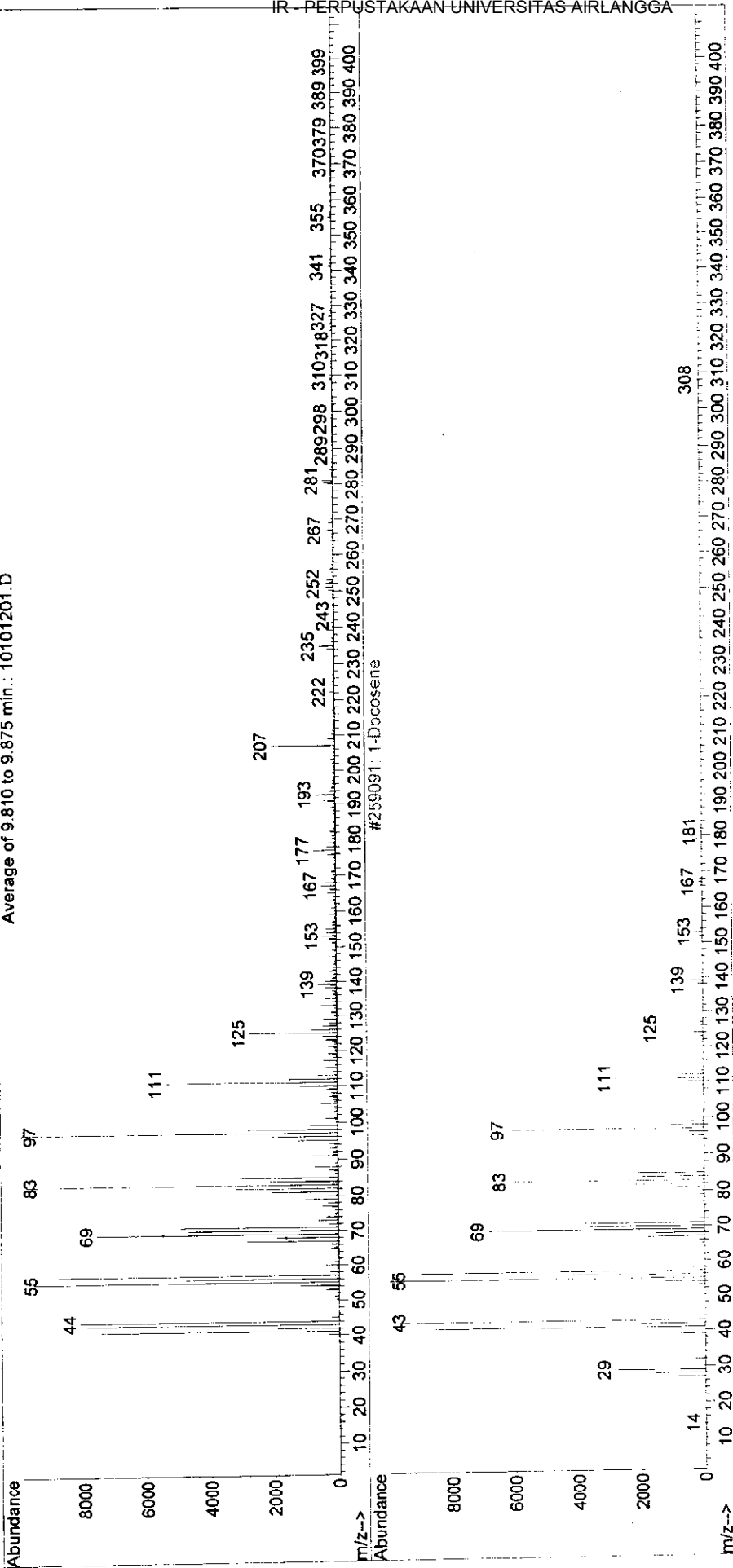


ID : Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) 55-184-6
Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) 55-184-6
Methyl n-hexadecanoate Unipharm A60 Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) 55-184-6
Methyl ester Palmitic acid, methyl ester (CAS) 55-184-6
PALMITIC ACID-



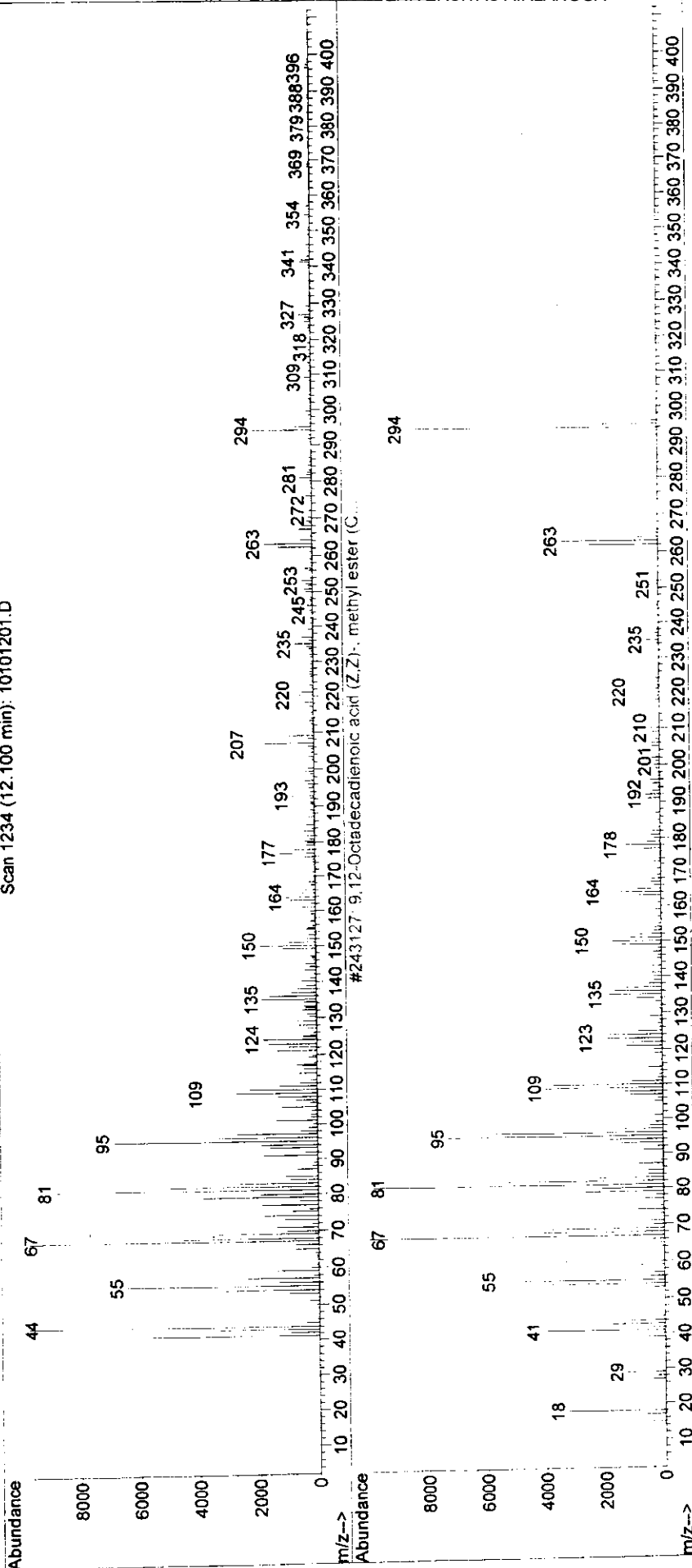
Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
Quality : 97
ID : 1-Docosene

Average of 9.810 to 9.875 min.: 10101201.D

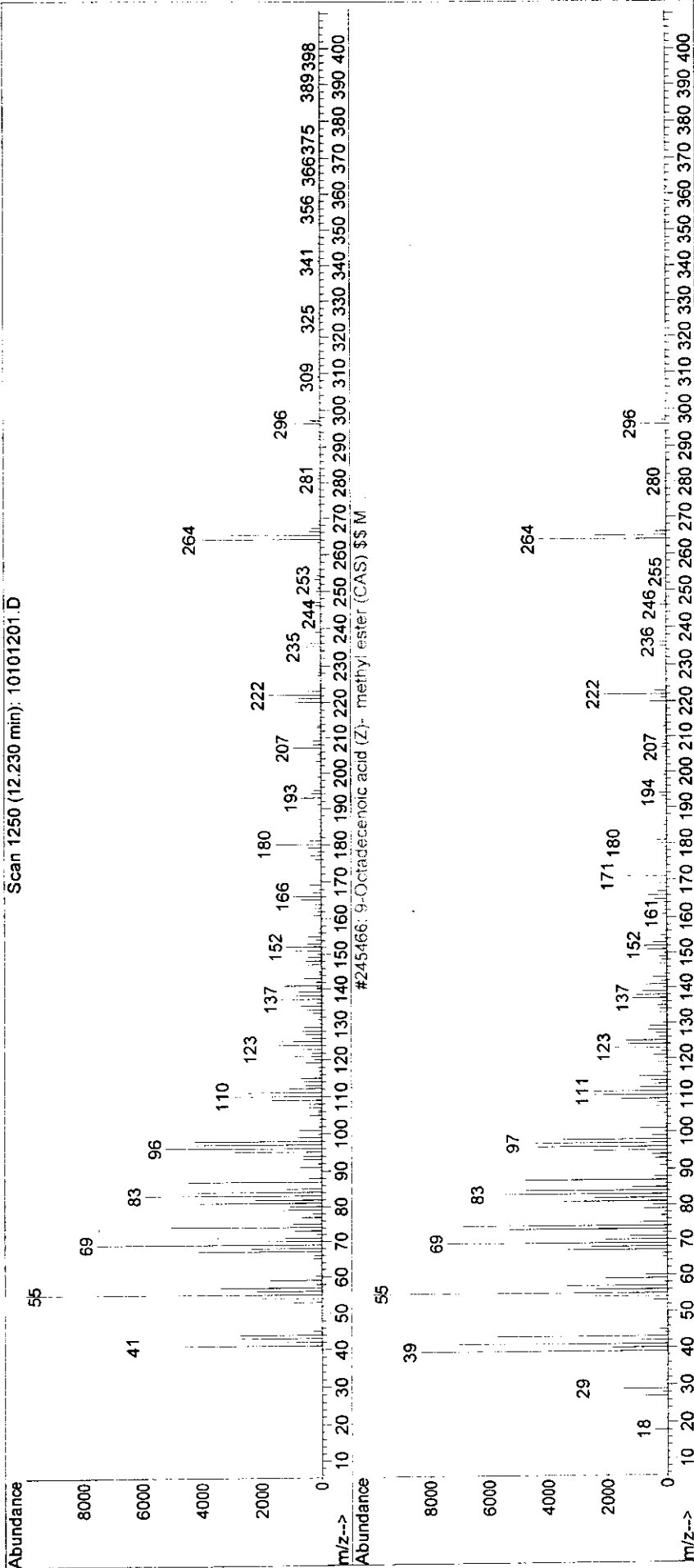


Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
 Quality : 99
 ID : 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (CAS) \$\$ Methyl linoleate \$\$ METHYL
 L CIS-9,CIS-12-OCTADECADIENOATE \$\$ Methyl octadecadienoate \$\$ Linoleic acid methyl
 ester \$\$ Linoleic acid, methyl ester \$\$ Methyl cis,cis-9,12-octadecadienoate \$\$
 Methyl 9-ci

Scan 1234 (12.100 min): 10101201.D



Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
 Quality : 99
 ID : 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS) \$\$ Methyl oleate \$\$ Methyl oleate cis-9-octadecenoate \$\$ Oleic acid methyl ester \$\$ Oleic acid, methyl ester \$\$ Emyery oleic acid ester 2301 \$\$ OLEIC ACID-METHYL ESTER \$\$ (Z)-9-OCTADECENOIC ACID, METHYL ESTER \$\$ (Z)-9-

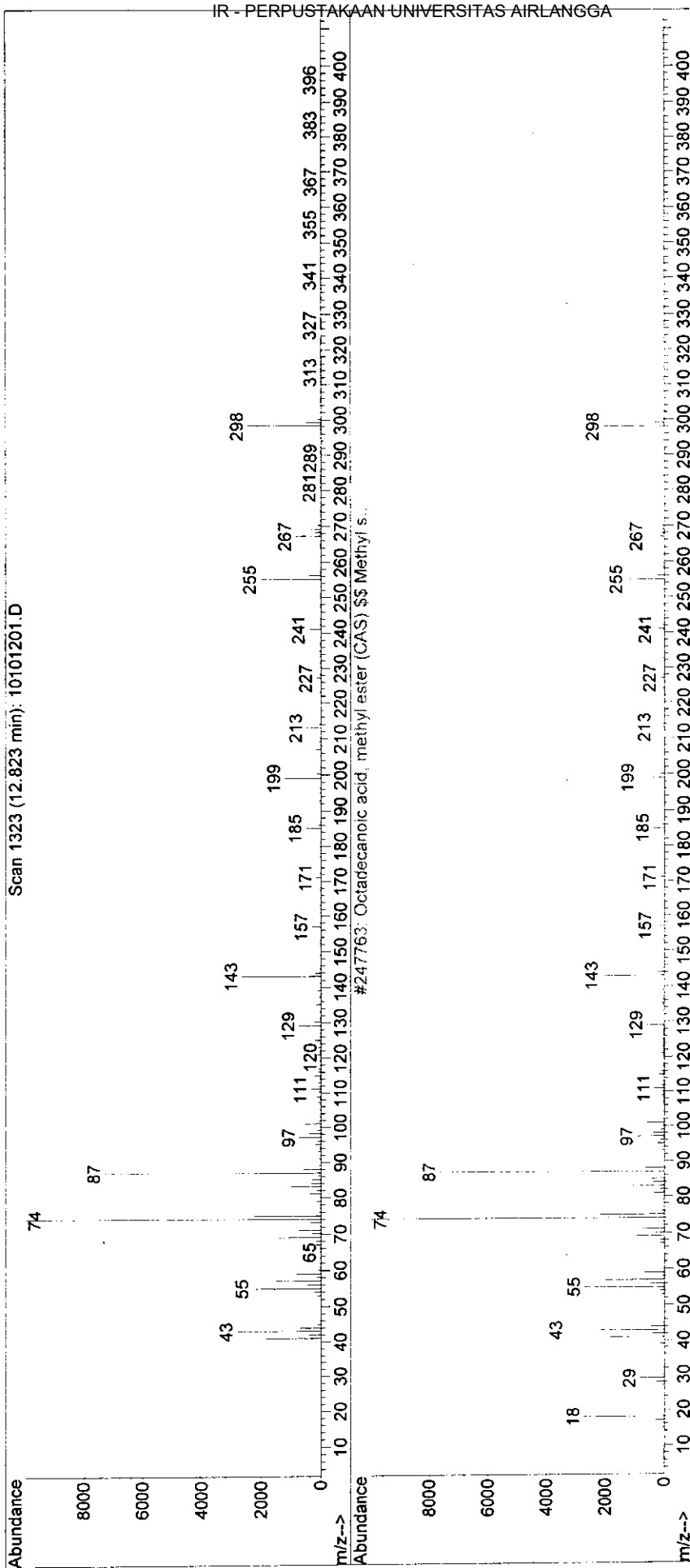


Library Searched : C:\Database\wiley7n.1

Quality : 99

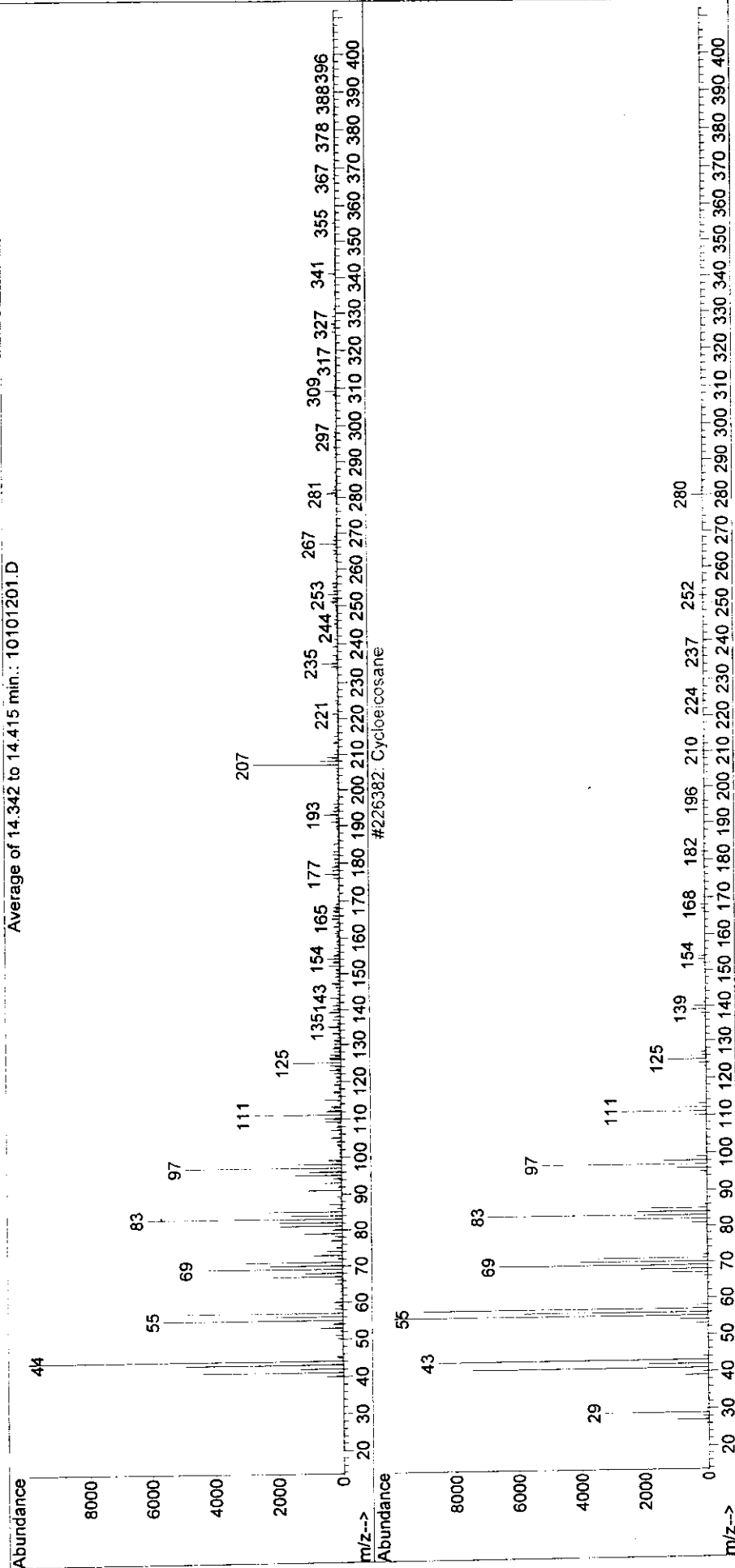
Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) \$\$ Methyl stearate \$\$ Methyl octadecanoate
\$\$ Methyl n-octadecanoate \$\$ Stearic acid methyl ester \$\$ Kemester 9718 \$\$ Steari
c acid, methyl ester \$\$ n-Octadecanoic acid methyl ester \$\$ Methyl-octadecanoate
\$\$ Methyl es

Scan 1323 (12.823 min): 10101201.D



Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
Quality : 95
ID : Cycloeoicosane

Average of 14.342 to 14.415 min.: 10101201.D



Library Searched : C:\Database\wiley7n.1
Quality : 38
ID : 1,3-Adamantanediacetamide

Scan 1878 (17.332 min): 10101201.D

