

1. SURFACE - ACTIVE AGENTS.

2. HYDROCARBON IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSEITAS AIRLANGGA

KK

TKD 18/01

Fat

n

TESIS

UJI KEMAMPUAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN OLEH BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DARI PELABUHAN TANJUNG PERAK SURABAYA

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



FATIMAH

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001

TESIS

**UJI KEMAMPUAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN
OLEH BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK
DARI PELABUHAN TANJUNG PERAK SURABAYA**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



FATIMAH

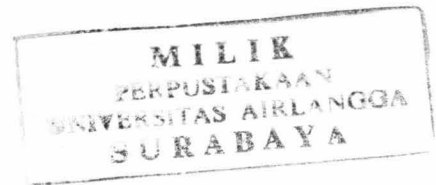
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

**UJI KEMAMPUAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN
OLEH BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK
DARI PELABUHAN TANJUNG PERAK SURABAYA**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Oleh :

FATIMAH

NIM 099813037/M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 19 Februari 2001


iii

Lembar Persetujuan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 8 FEBRUARI 2001**

oleh

Pembimbing Ketua



**Dr. Ni'matuzahroh
NIP 132 011 697**

Pembimbing



**Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK.
NIP 130 783 547**

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga**



**Soetjipto, dr., MS., Ph.D
NIP. 130 687 606**

Telah diuji pada
Tanggal 19 Februari 2001
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Ni'matuzahroh

Anggota : 1. Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK.

2. Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., MS.

3. Dr. Ir. Tini Surtiningsih, DEA.

4. Neneng K. Djinawi, dr., MSc., SpMK.

*Karya ini kupersembahkan buat
Abi dan Umi tercinta
Kakak dan Adik tersayang
atas kesabaran, kasih sayang dan dukungannya.*

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wata'ala, karena atas rahmatnya sehingga saya diberi kekuatan menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih tak terhingga serta penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr. Ni'matuzahroh, pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya ucapkan kepada Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK, selaku pembimbing yang dengan penuh pengertian telah memberikan dukungan, bimbingan serta saran.

Saya sampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui pimpinan Proyek URGE (University Research Graduate Education) Dirjen Dikti Dr. Harjrial Aswidinnoor, Ir., MSc yang memberikan bantuan finansial dan kesempatan untuk mengikuti program pascasarjana di Universitas Airlangga dengan beasiswa URGE Batch V.

Dalam kesempatan ini, saya ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Mantan Pembimbing Ketua, Prof. Atasiati Idajadi, dr., SpMK (Alm.) yang dengan sabar dan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.
2. Rektor Universitas Airlangga, Prof. H. Soedarto, dr., DTMH., Ph.D. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program magister.

3. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Muhammad Amin, dr. atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa program magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
4. Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, dr. Soetjipto, MS., Ph.D.
5. Mantan Ketua Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Airlangga, Dr. Bambang Irawan, MSc. yang telah memberi kemudahan dalam menggunakan fasilitas di Laboratorium Biologi.
6. Rekan-rekan Mikrobiologi angkatan 1998/1999 (Bu Tri, Pak Agus, Pak Azwar dan Pak Darno) yang bersama-sama berjuang merenda masa depan dengan harapan esok akan lebih baik.
7. Rekan-rekan biologi angkatan 1993/1994 (Via, Sriyati, Endah, Ita dan Ahmad Thontowi) atas dukungan, motivasi dan bantuannya dalam pengadaan literatur.
8. Milasari, Iswanti, Yulia dan Anis, mahasiswa biologi yang turut membantu terselesaikannya penelitian ini.
9. Bpk. Sukadji, laboran jurusan biologi FMIPA UNAIR atas segala bantuan dan dukungannya.
10. Terkhusus, kedua orang tua saya yang telah banyak memberikan bantuan moril maupun materiil, dorongan dan kekuatan do'a yang mereka panjatkan.
11. Semua pihak yang turut membantu dalam penyelesaian tesis ini, yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Saya menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu saran dan kritik membangun dari semua pihak demi sempurnanya naskah ini sangat

saya harapkan. Akhirnya semoga tesis ini bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan dimasa kini dan akan datang.

Surabaya, 19 Februari 2001

Penulis

RINGKASAN

Penggunaan surfaktan sintetis untuk mengatasi pencemaran lingkungan oleh hidrokarbon minyak, bertujuan untuk meningkatkan kelarutan hidrokarbon sehingga mudah didegradasi oleh mikroorganisme. Namun penggunaan surfaktan ini menimbulkan masalah bagi organisme hidup karena bersifat toksik, *non degradable* serta menghambat proses degradasi oleh mikroorganisme itu sendiri.

Penggunaan biosurfaktan, yaitu surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme, memberikan harapan untuk upaya bioremediasi lingkungan perairan yang tercemar minyak. Akhir-akhir ini banyak dilakukan upaya untuk mencari strain-strain yang berpotensi dalam menghasilkan biosurfaktan dengan cara menumbuhkannya dalam berbagai jenis substrat pertumbuhan.

Indikator produksi biosurfaktan oleh mikroorganisme adalah terbentuknya emulsi hidrokarbon oleh supernatan kultur, serta penurunan nilai tegangan permukaan kultur pertumbuhan.

Penelitian jenis eksperimental laboratoris dengan rancangan faktorial ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis strain bakteri, jenis substrat pertumbuhan dan interaksi antara keduanya terhadap produksi biosurfaktan. Analisis data dilakukan dengan ANAVA 2 arah dengan derajat signifikansi 5%. Adanya perbedaan pengaruh antar variabel penelitian diuji lanjut dengan uji t.

Analisis terhadap produksi biosurfaktan dilakukan dengan menguji aktivitas emulsifikasi dan penurunan tegangan permukaan yang dihasilkan oleh supernatan

kultur bakteri. Bakteri uji (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1* dan *Alcaligenes sp.1*) adalah hasil isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya yang diduga memproduksi biosurfaktan. Ketiga bakteri ditumbuhkan pada tiga jenis substrat pertumbuhan yang berbeda (ekstrak yeast + glukosa, pelumas dan heksadekan).

Diperoleh hasil ketiga strain bakteri mampu menghasilkan biosurfaktan meskipun dengan tingkat kemampuan yang berbeda. Perbedaan kemampuan dalam memproduksi biosurfaktan dipengaruhi oleh jenis strain bakteri, jenis substrat dan interaksi keduanya. Strain *Arthrobacter sp.1* menunjukkan aktivitas emulsifikasi tertinggi dan penurunan tegangan permukaan terbaik. Heksadekan merupakan substrat pertumbuhan yang baik dalam mempengaruhi produksi biosurfaktan, sedangkan kombinasi terbaik antara jenis bakteri dan jenis substrat ditunjukkan oleh *Arthrobacter sp. 1* dan *Pseudomonas sp. 7* yang ditumbuhkan dalam heksadekan. Keduanya mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agen penghasil biosurfaktan.

ABSTRAK

Biosurfaktan, metabolit mikroba yang memiliki sifat seperti surfaktan, diusulkan untuk menggantikan surfaktan sintetik dalam mengatasi pencemaran lingkungan oleh hidrokarbon minyak.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan tiga strain bakteri hidrokarbonoklastik yaitu *Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1* dan *Alcaligenes sp.1* yang diisolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya dalam memproduksi biosurfaktan, juga untuk mengetahui pengaruh dari jenis strain bakteri, jenis substrat (ekstrak yeast + glukosa, heksadekan, pelumas) dan interaksi antara keduanya terhadap produksi biosurfaktan.

Produksi biosurfaktan diamati dengan mengukur aktivitas emulsifikasi menggunakan metode Johnsons *et al.*(1992) dan penurunan tegangan permukaan supernatan kultur (menggunakan tensiometer Du Nouy) pada fase stasioner. Uji aktivitas emulsifikasi menggunakan tiga jenis senyawa hidrokarbon yaitu solar, minyak pelumas dan heksadekan.

Rancangan penelitian ini menggunakan pola faktorial 3 x 3 dengan ulangan sebanyak 5x. Data dianalisa dengan ANAVA 2 arah ($p = 0,05$), perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji t.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh jenis bakteri, jenis substrat serta interaksi keduanya terhadap produksi biosurfaktan. Kombinasi terbaik ditunjukkan oleh *Arthrobacter sp.1* dan *Pseudomonas sp. 7* dalam heksadekan. *Arthrobacter sp.1* dalam heksadekan mampu menunjukkan aktivitas emulsifikasi tertinggi (terhadap solar, heksadekan dan pelumas), serta mampu menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur sebesar 17 dyne/cm. *Pseudomonas sp. 7* dalam heksadekan mampu menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur sebesar 20 dyne/cm, namun aktivitas emulsifikasinya rendah.

Kata kunci : Aktivitas emulsifikasi, penurunan tegangan permukaan, biosurfaktan.

ABSTRACT

Biosurfactant, microbial metabolit whose properties like surfactant, was proposed to replace synthetic surfactant in environmental pollution by oil hydrocarbons.

This research was done to know the potention of three strains of hydrocarbonoclastic bacteria, i.e. *Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, and *Alcaligenes sp. 1* isolated from Tanjung Perak Harbour, Surabaya for biosurfactant production, also to know the effect of those strains, type of substrats (yeast ekstrak + glucose, hexadecane and lubrication oil) and interaction of both for biosurfactant production.

Biosurfactant production was observed by measured emulsification activity used Johnsons et al. (1992) method, and surface tension reduction of cell free broth (used tensiometer Du Nouy) in stationary phase. Emulsification activity test used three kinds of hydrocarbon, i.e. solar, hexadecane, and lubrication oil.

This research used factorial design 3x3 with five replication. The dates was analyzed by ANOVA (p:0.05) and using t test to show the differences of treatments.

The result showed that there was the effect of kind of bacteria, the type of substrate and interaction of both for biosurfactant production. The best combination was showed by *Arthrobacter sp.1* and *Pseudomonas sp. 7* were grown on hexadecane. *Arthrobacter sp. 1* on hexadecane could show the highest emulsification activity (on solar, lubrication oil and hexadecane) and decreased surface tension 17 dyne/cm. *Pseudomonas sp. 7* on hexadecane could decrease surface tension 20 dyne/cm, but this combination had lower emulsification activity.

Key words : Biosurfactant, emulsification activity, surface tension reduction.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia Penguji	v
Ucapan Terima kasih	vi
Ringkasan	ix
Abstrak	xi
Abstract	xii
Daftar Isi	xiii
Daftar Tabel	xvi
Daftar Gambar	xviii
Daftar Lampiran	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus.....	4

1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Hidrokarbon Minyak	5
2.1.1 Sumber hidrokarbon di perairan	5
2.1.2 Komposisi minyak bumi	5
2.1.3 Degradasi oleh mikroba	6
2.1.4 Kelarutan hidrokarbon	7
2.1.5 Pengambilan hidrokarbon oleh bakteri	8
2.2 Karakteristik dan Sifat Biosurfaktan	11
2.3 Biosintesis Biosurfaktan	13
2.4 Regulasi Sintesis Biosurfaktan	14
2.5 Potensi dan Aplikasi Biosurfaktan	17
2.6 Produksi Biosurfaktan	18
2.7 Tinjauan tentang Bakteri Uji	21
2.7.1 <i>Pseudomonas sp.</i> 7	21
2.7.2 <i>Arthrobacter sp.</i> 1	21
2.7.3 <i>Alcaligenes sp.</i> 1	22
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	24
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	24
3.2 Hipotesis Penelitian	28
BAB 4 METODE PENELITIAN	29
4.1 Rancangan Penelitian	29
4.2 Populasi dan Sampel	29

4.3	Variabel Penelitian	29
4.3.1	Klasifikasi variabel	29
4.3.2	Definisi operasional variabel	30
4.4	Bahan Penelitian	31
4.5	Instrumen Penelitian	32
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	32
4.7	Prosedur Pengumpulan Data	33
4.8	Analisis Data	42
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	44
5.1	Kurva Pertumbuhan Bakteri	44
5.2	Uji Aktivitas Emulsifikasi	47
5.3	Uji Tegangan Permukaan	55
BAB 6	PEMBAHASAN	59
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	67
7.1	Kesimpulan	67
7.2	Saran	67
	Daftar Pustaka	69
	Lampiran	72

DAFTAR TABEL

Tabel	2.1	Kelompok biosurfaktan yang diproduksi oleh mikroorganismenya	19
Tabel	2.2	Karakteristik fisiologis dan nutritif strain bakteri uji	23
Tabel	4.1	Nilai rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur bakteri pada beberapa substrat (nilai OD)	42
Tabel	4.2	Nilai Tegangan permukaan kultur supernatan beberapa bakteri pada beberapa substrat (dyne/cm)	43
Tabel	5.1	Waktu generasi bakteri uji pada beberapa substrat pertumbuhan ...	46
Tabel	5.2	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak solar dengan perlakuan jenis bakteri (<i>Pseudomonas sp.7</i> , <i>Arthrobacter sp.1</i> , dan <i>Alcaligenes sp.1</i>) (Nilai OD).....	47
Tabel	5.3	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak pelumas dengan perlakuan jenis bakteri (<i>Pseudomonas sp.7</i> , <i>Arthrobacter sp.1</i> , dan <i>Alcaligenes sp.1</i>) (Nilai OD)	48
Tabel	5.4	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap heksadekan dengan perlakuan jenis bakteri (<i>Pseudomonas sp.7</i> , <i>Arthrobacter sp.1</i> , dan <i>Alcaligenes sp.1</i>) (Nilai OD)	49
Tabel	5.5	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak solar dengan perlakuan jenis substrat (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan, pelumas) (Nilai OD)	49
Tabel	5.6	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak pelumas dengan perlakuan jenis substrat (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan, pelumas) (Nilai OD).....	50

Tabel 5.7	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap heksadekan dengan perlakuan jenis substrat (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan, pelumas) (Nilai OD)	50
Tabel 5.8	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak solar dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat. (Nilai OD)	51
Tabel 5.9	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak pelumas dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat. (Nilai OD)	52
Tabel 5.10	Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap heksadekan dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat. (Nilai OD)	52
Tabel 5.11	Rata-rata dan simpangan baku tegangan permukaan supernatan kultur dengan perlakuan jenis bakteri (<i>Pseudomonas sp.7.</i> , <i>Arthrobacter sp.1</i> , dan <i>Alcaligenes sp.1</i>) (dyne/cm)	56
Tabel 5.12	Rata-rata dan simpangan baku tegangan permukaan supernatan kultur dengan perlakuan jenis substrat (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan dan minyak pelumas) (dyne/cm)	56
Tabel 5.13	Rata-rata dan simpangan baku tegangan permukaan supernatan kultur dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat (dyne/cm)	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Komponen – komponen sistem biodegradasi hidrokarbon	10
Gambar 2.2 Struktur molekul biosurfaktan	12
Gambar 2.3 Bentuk morfologi <i>Pseudomonas sp. 7</i> dengan pengecatan gram (pembesaran 1000x)	21
Gambar 2.4 Bentuk morfologi <i>Arthrobacter sp.1</i> dengan pengecatan gram (pembesaran 1000x)	22
Gambar 2.5 Bentuk morfologi <i>Alcaligenes sp. 1</i> dengan pengecatan gram (pembesaran 1000x)	23
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual penelitian	27
Gambar 4.1 Bagan alir prosedur penelitian	40
Gambar 4.2 Bagan alir tata cara pengukuran aktivitas emulsifikasi.....	41
Gambar 4.3 Bagan alir tata cara pengukuran tegangan permukaan	41
Gambar 5.1 Kurva pertumbuhan bakteri dalam substrat ekstrak yeast dan glukosa	44
Gambar 5.2 Kurva pertumbuhan bakteri dalam substrat heksadekan	45
Gambar 5.3 Kurva pertumbuhan bakteri dalam substrat pelumas	45
Gambar 5.4 Rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap solar dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat	54
Gambar 5.5 Rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap heksadekan dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat	54

Gambar 5.6 Rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap pelumas dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat	55
Gambar 5.7 Rata-rata nilai tegangan permukaan supernatan kultur dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat	58

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Nilai aktivitas emulsifikasi supernatan kultur masing-masing bakteri pada masing-masing substrat (Nilai OD 610 nm)	72
Lampiran 2 : Nilai tegangan permukaan supernatan kultur masing-masing bakteri pada masing-masing substrat (dyne/cm)	73
Lampiran 3 : Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat terhadap aktivitas emulsifikasi pada solar	74
Lampiran 4 : Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat terhadap aktivitas emulsifikasi pada pelumas	75
Lampiran 5 : Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat terhadap aktivitas emulsifikasi pada heksadekan	76
Lampiran 6 : Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat terhadap nilai tegangan permukaan supernatan kultur	77

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Pencemaran lingkungan oleh senyawa hidrokarbon minyak terus mengalami peningkatan dan telah menimbulkan dampak yang berarti bagi kesehatan organisme hidup (Atlas,1991). Bioremediasi merupakan salah satu upaya untuk mengurangi bahan pencemar dengan bantuan organisme hidup. Biodegradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme (bakteri dan jamur) telah diketahui sebagai mekanisme utama dalam proses eliminasi senyawa hidrokarbon di laut (Ni'matuzahroh, 1999).

Salah satu faktor yang sering membatasi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon adalah sifat kelarutannya yang rendah (Francy, 1991) sehingga sulit mencapai sel mikroorganisme.

Upaya yang umum dilakukan untuk meningkatkan kelarutan substrat hidrokarbon adalah dengan pemberian surfaktan sintetis. Penggunaan surfaktan ini menimbulkan masalah bagi organisme hidup karena bersifat toksik, *non degradable* serta dapat menghambat proses degradasi oleh mikroorganisme (Laha and Luthy, 1992 dalam Willumsen, *et al.*, 1997).

Alternatif penggunaan surfaktan sintetis untuk meningkatkan biodegradasi hidrokarbon adalah penggunaan biosurfaktan. Penggunaan surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme ini mempunyai keuntungan lebih dibanding penggunaan

surfaktan sintetis, karena sifatnya yang tidak toksik dan lebih mudah didegradasi oleh mikroorganisme (Richana *et al.*, 1998).

Biosurfaktan merupakan komponen mikroorganisme yang terdiri dari molekul-molekul hidrofobik dan hidrofilik, yang mampu mengikat molekul-molekul hidrokarbon tidak larut air dan mampu menurunkan tegangan permukaan. Selain itu, biosurfaktan secara ekstraseluler menyebabkan emulsifikasi hidrokarbon sehingga mudah untuk didegradasi (Koch, *et al.*, 1991).

Penelitian mengenai bakteri penghasil biosurfaktan telah banyak dilakukan baik dengan menumbuhkan pada substrat larut maupun substrat tidak larut. Carillo *et al.* (1996) menyatakan bahwa mikroorganisme dapat memproduksi biosurfaktan ketika ditumbuhkan pada substrat yang tidak larut (seperti hidrokarbon, minyak dan lilin) atau pada substrat yang terlarut (karbohidrat). Miguez and Ingram (1986) menunjukkan adanya produksi biosurfaktan oleh *P. aeruginosa* ketika ditumbuhkan dalam dua substrat yang berbeda, yaitu glukosa dan heksadekan. Namun produksi biosurfaktan pada substrat heksadekan menunjukkan aktivitas emulsifikasi yang lebih baik serta penurunan tegangan permukaan secara signifikan.

Dalam upaya mengoptimalkan bioremediasi lingkungan perairan di Indonesia, pencarian strain lokal yang mempunyai kapasitas tinggi dalam mendegradasi senyawa pencemar dan berkemampuan menghasilkan biosurfaktan adalah sangat diharapkan. Oleh sebab itu penelitian ini diarahkan untuk mengangkat ke permukaan mengenai kemampuan beberapa strain bakteri lokal yang diisolasi dari perlabuhan Tanjung Perak Surabaya dalam memproduksi biosurfaktan, serta untuk

mengetahui pengaruh jenis bakteri, jenis substrat pertumbuhan dan interaksi antara keduanya terhadap produksi biosurfaktan.

Penelitian terdahulu (Ni'matuzahroh, 1999) telah memperoleh sejumlah strain bakteri yang diduga berpotensi menghasilkan biosurfaktan yang diisolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Pada penelitian ini dipilih 3 strain dari 3 genus yang berbeda yaitu *Pseudomonas sp. 7*, *Alcaligenes sp. 1*, dan *Arthrobacter sp. 1*. Selanjutnya dilakukan uji kemampuan ketiga strain bakteri dalam memproduksi biosurfaktan pada tiga substrat yang berbeda (ekstrak yeast+glukosa, heksadekan, pelumas), sehingga diperoleh strain yang berpotensi serta substrat yang lebih baik dalam produksi biosurfaktan.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang permasalahan di atas, maka diajukan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah jenis strain bakteri uji mempengaruhi produksi biosurfaktan ?
2. Apakah jenis substrat mempengaruhi produksi biosurfaktan yang dihasilkan oleh ketiga strain bakteri hidrokarbonoklastik yang diuji ?
3. Apakah interaksi antara jenis strain bakteri uji dan jenis substrat mempengaruhi produksi biosurfaktan ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui strain bakteri (dari ketiga strain bakteri uji) yang paling berpotensi dalam memproduksi biosurfaktan.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh jenis bakteri terhadap produksi biosurfaktan.
2. Untuk mengetahui pengaruh jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan.
3. Untuk mengetahui pengaruh interaksi antara jenis bakteri dan jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kemampuan bakteri hidrokarbonoklastik strain lokal, yang diisolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya, dalam memproduksi biosurfaktan. Sehingga pada akhirnya diperoleh strain bakteri yang berpotensi dalam memproduksi biosurfaktan yang dapat digunakan dalam upaya bioremediasi lingkungan perairan Indonesia yang tercemar minyak.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hidrokarbon Minyak

2.1.1 Sumber hidrokarbon di perairan

Petroleum umumnya lebih dikenal dengan nama minyak bumi. Berdasarkan namanya petroleum berasal dari bahasa latin yaitu *petra* yang berarti batuan dan *oleum* yang berarti minyak. Petroleum merupakan suatu campuran yang sangat kompleks, sebagian besar terdiri atas hidrokarbon (senyawa yang terdiri dari atom C dan H) dan sebagian kecilnya terdiri dari sulfur, oksigen, dan nitrogen (Atlas, 1992).

Hidrokarbon petroleum yang masuk ke dalam perairan, berasal dari sumber-sumber berikut : 1. kecelakaan dalam pelayaran, 2. pengeboran minyak lepas pantai, 3. pembersihan tanki-tanki kapal, 4. buangan limbah minyak dari industri dan auto mobil, dan 5. kerusakan jaringan pipa (Mitchell, 1974).

2.1.2 Komposisi minyak bumi

Minyak bumi dari berbagai sumber minyak pada umumnya mempunyai komposisi yang berbeda-beda. Secara kualitatif terdiri atas komponen hidrokarbon dan non hidrokarbon.

Komposisi minyak bumi didasarkan senyawa hidrokarbon adalah sebagai berikut :

1. Parafin/alkana. Dalam minyak kasar sebanyak 25 %, diperoleh dari fraksi didih rendah yaitu 40 – 230 °C, yang terbagi lagi menjadi isoparafin (rantai karbon bercabang) dan parafin normal (rantai karbon lurus).
2. Sikloparafin/sikloalkana/naften yaitu hidrokarbon yang memiliki struktur cincin, mengisi sekitar 30-60 % dari minyak bumi. Sikloparafin yang paling sering dijumpai adalah siklopentana dan sikloheksana.
3. Hidrokarbon aromatik, memiliki struktur cincin, namun berbeda dengan sikloparafin yang terletak pada ikatan karakteristik yang memungkinkan adanya elektron terdelokalisasi pada cincin aromatik. Contoh hidrokarbon aromatik yang paling sederhana adalah benzena (Semar, 1986).

2.1.3 Degradasi oleh mikroba

Dalam purifikasi air yang tercemar minyak, mikroba memainkan peranan penting, terutama bakteri yang mendekomposisi hidrokarbon. Ketika minyak mentah masuk ke dalam perairan dan kontak dengan air, maka selanjutnya akan didegradasi oleh mikroba. Komponen-komponen minyak yang larut dalam air, dipecah dengan sangat cepat oleh mikroba (Heyer, 1966 *dalam* Rheinheimer, 1980). Hanya lapisan minyak yang tipis saja yang hilang dengan sangat cepat. Sedang lapisan minyak yang lebih tebal dipecah sangat perlahan oleh mikroba dari bagian permukaan. Sehingga peran mikroba kurang begitu besar bila dihadapkan pada pencemaran minyak dalam skala besar (Gunkell, 1967 *dalam* Rheinheimer, 1980)

Selain itu kerentanan biodegradasi hidrokarbon minyak bervariasi, bergantung pada tipe dan ukuran molekul hidrokarbon (Atlas, 1993). Alkana dengan rantai lurus

lebih mudah didegradasi dan dalam waktu tujuh hari sudah hilang. Alkana dengan rantai bercabang lebih resisten dan tertinggal di dalam perairan selama berbulan-bulan (Mitchell, 1974).

Dalam habitat alami, biodegradasi hidrokarbon mengikuti aturan berikut : (1) alkana lebih cepat terdegradasi dibanding hidrokarbon aromatik. (2) pada alkana, rantai lurus lebih mudah didegradasi dibanding rantai bercabang. (3) rantai dengan jumlah atom karbon antara 10 dan 18, paling cepat teroksidasi. Metana, etana dan propana hanya diserang oleh organisme yang sangat khusus. Lilin (*waxes*) yang terdiri lebih dari 30 atom karbon bersifat sukar larut, sehingga bersifat *recalcitrant* (sukar untuk didegradasi). (4) pada hidrokarbon aromatik, senyawa polisiklik dan benzena yang tersubstitusi alkil lebih cepat terdegradasi dibanding benzena (Mitchell, 1974).

2.1.4 Kelarutan hidrokarbon

Salah satu faktor yang sering membatasi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon adalah sifat kelarutannya yang rendah, sehingga sulit mencapai sel mikroorganisme (Francy *et al.*, 1991). Nyn (1967) dalam Rheinheimer (1980) menyatakan bahwa kelarutan hidrokarbon di dalam air adalah rendah dan menurun dengan kenaikan berat molekul. Selain itu Aliakrinskaya (1966) dalam Rheinheimer (1980) menyatakan bahwa air laut menurunkan kelarutan petroleum dibanding air tawar, sehingga jumlah hidrokarbon terlarut per unit volume yang bisa digunakan bakteri sangat kecil.

Upaya yang umum dilakukan untuk meningkatkan kelarutan substrat hidrokarbon adalah dengan pemberian surfaktan. Gunkell (*Personal Communication*) dalam Rheinheimer (1980) menemukan 50 juta bakteri terdapat dalam tiap ml emulsi minyak dalam air di laut utara (dengan kandungan air sekitar 50%). Sedangkan pada air laut di sekitarnya hanya dijumpai 50 bakteri per ml nya. Ini merupakan alasan mengapa pengemulsi buatan (bahan-bahan yang mengandung surfaktan) seringkali digunakan dalam upaya untuk mengatasi pencemaran minyak. Surfaktan, sebagian besar beracun bagi organisme perairan, sehingga menyebabkan kerusakan yang lebih besar dibanding minyak itu sendiri. Beberapa jenis surfaktan dapat menghambat pertumbuhan bakteri, akhirnya akan menghalangi degradasi minyak oleh mikroba.

Penggunaan deterjen di perairan dapat memindahkan minyak yang ada di permukaan perairan, tetapi dispersi minyak tersebut dapat meningkatkan paparan organisme perairan dengan polutan. Sehingga menimbulkan kerusakan dan kematian pada organisme yang hidup di dalamnya (Atlas, 1993).

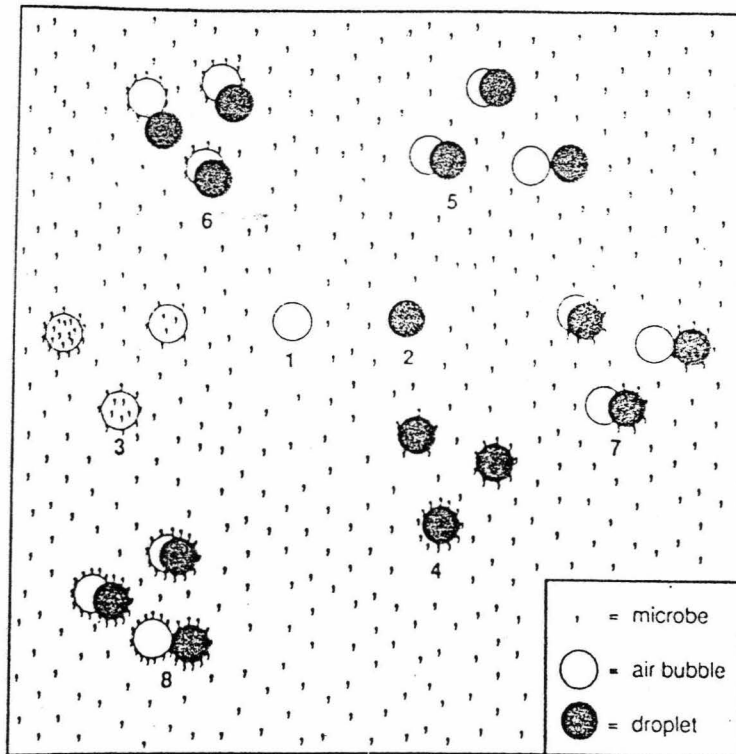
2.1.5 Pengambilan substrat hidrokarbon oleh mikroba

Terdapat tiga cara transport hidrokarbon ke dalam sel mikroba secara umum yaitu **pertama** interaksi sel dengan hidrokarbon terlarut dalam fase air. Pada kasus ini umumnya rata-rata kelarutan hidrokarbon oleh proses fisika sangat rendah sehingga tidak dapat mendukung pertumbuhan mikroorganisme. **Kedua**, kontak langsung (perlekatan) sel dengan permukaan tetesan hidrokarbon yang lebih besar daripada sel mikroba. Pada kasus yang kedua ini sel mikroba melekat pada permukaan tetesan hidrokarbon yang lebih besar dari pada sel, dan pengambilan substrat dilakukan

dengan difusi atau transport aktif. Ketersediaan substrat untuk penempelan sel merupakan faktor yang membatasi pengambilan substrat. Kontak langsung antara hidrokarbon dengan sel menunjukkan adanya mekanisme yang penting dalam pengambilan substrat (Goswami and Singh, 1990). **Ketiga**, interaksi sel dengan tetesan hidrokarbon yang teremulsi atau tersolubilisasi oleh bakteri (Goswami and Singh, 1990). Pada kasus ini sel mikroba berinteraksi dengan partikel hidrokarbon yang lebih kecil daripada sel. Cara yang ketiga ini merupakan kebalikan dari kasus yang kedua. Dengan berkurangnya partikel substrat, maka daerah antar permukaan antara hidrokarbon dengan air akan bertambah, sehingga dapat meningkatkan pengambilan substrat oleh mikroba.

Produksi biosurfaktan merupakan salah satu mekanisme bakteri untuk dapat menggunakan substrat hidrokarbon. Biosurfaktan meningkatkan ketersediaan substrat tidak larut melalui beberapa mekanisme. Dengan adanya biosurfaktan, substrat yang berupa cairan akan teremulsi dibentuk menjadi misel-misel, dan menyebarkannya ke permukaan sel bakteri. Substrat yang padat dipecah oleh biosurfaktan, sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel (Gerson, 1993).

Mekanisme pengambilan substrat hidrokarbon cair oleh sel-sel mikroba melibatkan peristiwa fisika (fenomena antar permukaan) dan kimia. Gambar 2.1 menunjukkan interaksi fisika yang dapat terjadi antara sel mikroba, tetesan hidrokarbon dan gelembung udara selama proses fermentasi untuk menghasilkan biosurfaktan atau selama degradasi hidrokarbon dalam lingkungan perairan (Gerson, 1993).



Gambar 2.1 Komponen – komponen sistem biodegradasi hidrokarbon :

(1) gelembung udara, (2) tetesan hidrokarbon, (3) sel mikroba yang melekat pada gelembung udara, (4) sel mikroba yang melekat pada tetes hidrokarbon, (5) gabungan udara-hidrokarbon, (6) gabungan udara-hidrokarbon dengan mikroba yang melekat pada gelembung udara, (7) gabungan udara-hidrokarbon dengan mikroba yang melekat pada tetes hidrokarbon, dan (8) gabungan udara-hidrokarbon dengan mikroba yang melekat pada gelembung udara maupun tetes hidrokarbon (Gerson, 1993).

Perlekatan sel mikroba dengan gelembung udara, tetesan hidrokarbon cair dan permukaan hidrokarbon padat ditentukan oleh tegangan antar permukaan. Pada suhu ruangan, tegangan permukaan air sekitar 72 dyne/cm. Banyak surfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan sampai kira-kira 25 ± 5 dyne/cm tergantung pada konsentrasi dan jenis surfaktan. Sedikit sekali surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan dibawah kisaran tersebut pada kondisi normal. Surfaktan bertindak sebagai jembatan antara dua zat yang bertemu pada bagian antar

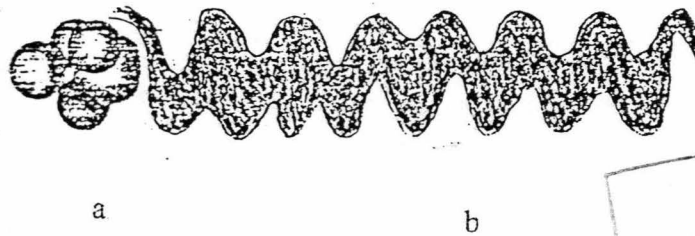
permukaan. Molekul-molekul surfaktan mempunyai bagian hidrofilik dan hidrofobik. Bagian hidrofilik tertanam dalam fase air, sedangkan bagian hidrofobik mengarah ke udara (Gerson, 1993).

2.2 Karakteristik dan Sifat Biosurfaktan

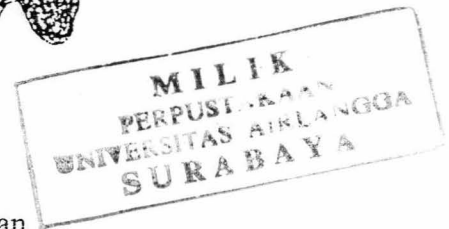
Selama tumbuh pada substrat yang spesifik, banyak mikroorganisme yang mensintesis bahan-bahan yang bersifat tensioaktif yang disebut biosurfaktan. Molekul biosurfaktan dapat bersifat ekstraseluler atau terdapat pada permukaan sel mikroorganisme (Bertrand *et al.*, 1997). Bila surfaktan dieksekresikan secara ekstraseluler menyebabkan emulsifikasi hidrokarbon dan bila terikat pada dinding sel, biosurfaktan membantu penetrasi hidrokarbon ke dalam ruang periplasmik (Koch *et al.*, 1991).

Biosurfaktan adalah molekul yang bersifat amfifatik, yang terdiri dari komponen hidrofilik dan hidrofobik. Sifat ini menyebabkan molekul-molekul tersebut berkumpul pada bagian interfase dan menurunkan tegangan permukaan media cair (Koch *et al.*, 1991; Van Dyke *et al.*, 1993; Bertrand *et al.*, 1997).

Bagian hidrofobik dari biosurfaktan umumnya berupa rantai hidrokarbon dari asam lemak, sedang bagian yang polar atau hidrofilik merupakan derivat dari ester atau golongan alkohol fungsional dari lemak netral, golongan karboksilat asam lemak atau asam amino (Koch *et al.*, 1991). Struktur molekul biosurfaktan digambarkan pada gambar 2.2 berikut ini :



Gambar 2.2 Struktur molekul biosurfaktan
Keterangan : a. Bagian Hidrofilik, b. Bagian Hidrofobik



Komposisi kimia biosurfaktan sangat bervariasi, dapat berupa asam lemak, fosfolipid, glikolipid, lipopeptida, lipoprotein, kompleks lemak – polisakarida, kompleks protein – polisakarida. Jenis biosurfaktan tergantung pada strain, substrat dan kondisi pertumbuhan (Bertrand *et al.*, 1997).

Pada sistem yang berupa cairan, biosurfaktan dapat meningkatkan jumlah senyawa hidrofobik terlarut melalui pemisahan senyawa tersebut ke dalam bentuk misel. (Van Dyke *et al.*, 1993).

Berdasarkan berat molekulnya, biosurfaktan dapat dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu : **surfaktan dengan berat molekul rendah** (seperti glikolipid, soforolipid, trehalosalipid, asam lemak dan fosfolipid) yang terdiri dari molekul hidrofobik dan hidrofilik. Kelompok kedua adalah **polimer dengan berat molekul besar**, yang dikenal dengan *bioemulsifier* polisakarida amfifatik. Dalam medium cair, bioemulsifier ini mempengaruhi pembentukan emulsi serta kestabilannya dan tidak selalu menunjukkan penurunan tegangan permukaan medium (Cooper, 1986 dalam Willumsen, 1997).

2.3 Biosintesis Biosurfaktan

Organisme menggunakan energi yang diperoleh melalui proses katabolisme untuk mensintesis komponen-komponen molekuler 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 amfifatik, 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 mempengaruhi 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.

2.4 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, mikroorganisme 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 calcoaceticus* 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 sumber nitrogen dan kation multivalensi

Efek sumber nitrogen dan Kation Multivalensi dalam medium berperan penting dalam metabolisme seluler, termasuk produksi biosurfaktan. Diantara garam anorganik yang diuji, garam amonium dan urea merupakan sumber nitrogen yang paling disukai oleh *Acinetobacter paraffineus*. Pada *Pseudomonas fluorescens* diketahui tergantung 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 mempengaruhi produksi biosurfaktan, selain tergantung pada jenis bakteri. Pada *Pseudomonas fluorescens*, terbatasnya konsentrasi zat besi dalam medium dapat menstimulasi produksi biosurfaktan. Sedangkan pada *B. subtilis* diketahui bahwa penambahan besi dan garam magnesium ke dalam medium pertumbuhan dapat menstimulasi pembentukan surfaktan (Desai and Desai, 1993).

2.5 Potensi dan Aplikasi Biosurfaktan

Perhatian dunia terhadap biosurfaktan semakin meningkat disebabkan keuntungan atau kelebihan-kelebihan yang dimilikinya dibanding surfaktan sintetis. Sifat yang dimiliki biosurfaktan meliputi toksisitasnya yang rendah, dapat didegradasi oleh mikroorganisme (*biodegradable*), dapat diproduksi dalam jumlah besar oleh mikroorganisme (Cooper and Zajic, 1980 ; Koch, *et al.*, 1991), mempunyai aktivitas biologis, mempunyai struktur yang beragam dan tidak mahal (Cooper and Zajic, 1980).

Biosurfaktan juga mempunyai selektivitas yang tinggi serta aktivitas yang spesifik pada temperatur, pH dan salinitas yang ekstrim dan dapat disintesis dari sumber yang dapat diperbarui (Velikonja and Kosaric, 1993).

Biosurfaktan merupakan pengemulsi yang sangat baik, emulsi yang dihasilkan seringkali lebih stabil dibanding yang dihasilkan oleh surfaktan sintetis. Keberadaan biosurfaktan dalam mikroorganisme adalah penting untuk *treatment* secara biologi pada lingkungan yang tercemar oleh senyawa hidrokarbon (Bertrand *et al.*, 1997).

Aplikasi biosurfaktan dalam perlindungan lingkungan berkaitan dengan bioremediasi petroleum hidrokarbon pada perairan dan tanah serta dalam mendegradasi bahan-bahan yang berbahaya (Carillo *et al.*, 1996).

Penggunaan biosurfaktan dalam mengatasi pencemaran air laut oleh hidrokarbon bertujuan untuk mendispersikan minyak dalam air (meningkatkan kelarutan) sehingga membantu proses biodegradasi. Pada pembersihan tanki-tanki dan *recovery* limbah padat, biosurfaktan digunakan untuk menurunkan viskositas limbah tersebut, membuatnya cukup larut dalam air untuk selanjutnya dipompa. Pada pencemaran pantai, biosurfaktan digunakan untuk membersihkan daerah pantai yang tercemar oleh tumpahan minyak (Bertrand *et al.*, 1997). Serta untuk memindahkan lumpur berminyak dari tanki penyimpanan minyak.

Selain untuk mengatasi pencemaran perairan oleh tumpahan minyak, kebutuhan akan biosurfaktan juga terjadi pada berbagai aktivitas industri yang menggunakan surfaktan yang disintesis secara kimia, seperti industri minyak, farmasi, agrikultur, industri pembuatan deterjen (Van Dyke *et al.*, 1991), industri makanan, kertas, tekstil, dan industri logam (Kosaric *et al.*, 1987 dalam Purwoko, 1997).

2.6 Produksi 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), mikroorganisme dapat memproduksi biosurfaktan ketika ditumbuhkan pada substrat yang tidak larut (seperti hidrokarbon, minyak dan lilin)

maupun pada substrat terlarut (karbohidrat). Diantara mikroba-mikroba tersebut, sebagian besar biosurfaktan diproduksi oleh bakteri. Sifat kimia dan fisika yang dimiliki oleh biosurfaktan seperti menurunkan tegangan permukaan zat cair dan stabilitas emulsi yang dibentuk adalah sangat penting dalam pencarian biosurfaktan yang potensial. Sifat-sifat ini digunakan dalam evaluasi biosurfaktan dan dalam skrining mikroorganisme yang berpotensi dalam memproduksi biosurfaktan. Jenis-jenis biosurfaktan penting dan spesies mikroba yang memproduksinya terdaftar dalam tabel 2.1. Kelompok biosurfaktan yang utama meliputi (1) glikolipid, (2) lipid dan asam lemak, (3) lipopeptida / lipoprotein, (4) surfaktan polimerik, dan (5) surfaktan partikulat (Desai and Desai, 1993)

Tabel 2.1 Kelompok biosurfaktan yang diproduksi oleh mikroorganisme

Jenis biosurfaktan	Spesies mikroba yang memproduksi
A. Glycolipid Trehalosa mykolat Trehalosa ester Mono-, di-, dan Trisakarida mykolat Rhamnolipid Sophorolipid	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Arthrobacter spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Candida spp.</i>
B. Phospholipid dan Asam lemak Phospholipid dan asam lemak Phospholipid	<i>Candida spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus spp.</i>
C. Lipopeptida dan lipoprotein	

Gramiciden	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxin	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ornithin-lipid	<i>Pseudomonas rubescens</i>
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Cerilipin	<i>Gluconobacter cerinus</i>
Lysin-lipid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	<i>Streptomyces sioyaensis</i>
Surfactin-subtilysin	<i>Bacillus subtilis</i>
Peptida-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>
D. Surfactan polimer	
Lipo hetero polisakarida	<i>Arthrobacter calcoaceticus RAG-1</i>
Heteropolisakarida	<i>A. calcoaceticus A2</i>
Polisakarida-protein	<i>A. calcoaceticus</i> strains
	<i>Candida lipolytica</i>
Manno-protein	<i>S. cerevisiae</i>
Karbohidrat-protein	<i>Candida petrophilum</i>
	<i>Endomycopsis lipolytica</i>
Mannan-komplek lipid	<i>Candida tropicalis</i>
Mannosa/erythrosa-lipid	<i>Shizonella melanogramma</i>
	<i>Ustilago maydis</i>
Komplek karbohidrat-protein-lipid	<i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Debaryomyces polymorphus</i>
E. Biosurfaktan partikular	
Vesikula membran	<i>Acinetobacter sp. H01-N</i>
Fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>
Seluruh bagian sel	Berbagai jenis mikroba

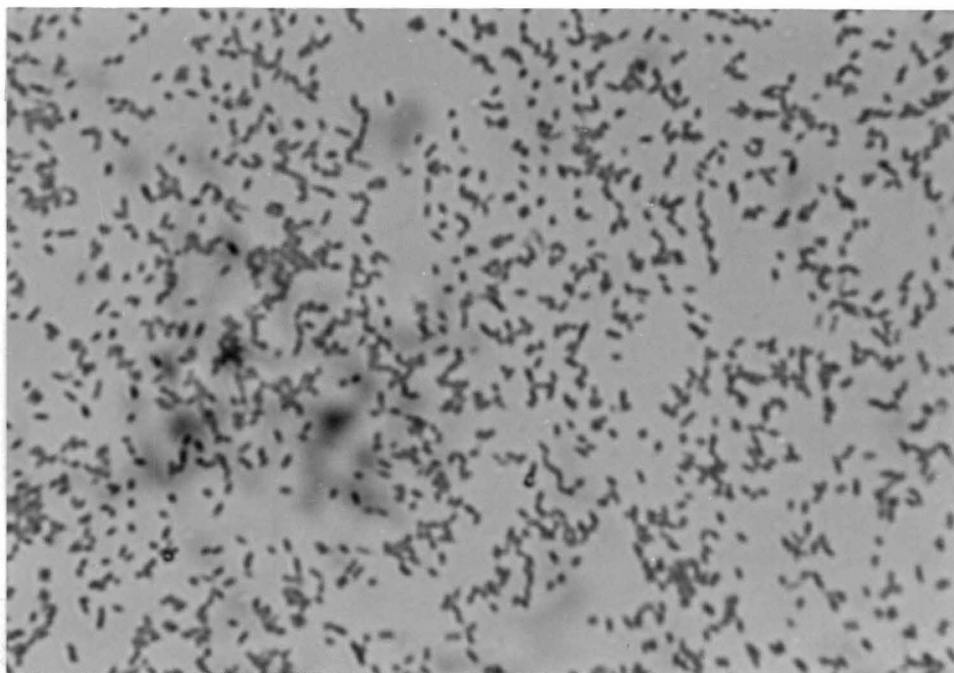
Sumber : Desai and Desai (1993)

Menurut Desai and Desai (1993), terdapat hubungan yang paralel antara penggunaan substrat, pertumbuhan dan produksi biosurfaktan. Pada *Pseudomonas sp.*, sumber karbon yang berbeda (seperti gliserol, glukosa, dan ethanol) dapat digunakan untuk produksi biosurfaktan, tapi produksi biosurfaktan pada ketiga substrat di atas masih lebih rendah bila dibanding dengan n-alkana sebagai sumber karbon. Pada alkana, produksi biosurfaktan dipengaruhi oleh panjang rantai hidrokarbon (Desai and Desai, 1993).

2.7 Tinjauan Tentang Bakteri Uji (Buchanan, 1986)

2.7.1 *Pseudomonas sp. 7*

Bakteri ini berbentuk batang lurus atau agak bengkok, dengan ukuran 0,5-1,0 x 1,5-5,0 μm , gram negatif, motil, mempunyai satu sampai beberapa flagel pada bagian kutub, jarang yang tidak motil, aerobik. Gambar 2.3 dibawah ini menunjukkan bentuk morfologi *Pseudomonas sp. 7* dengan pengecatan gram.

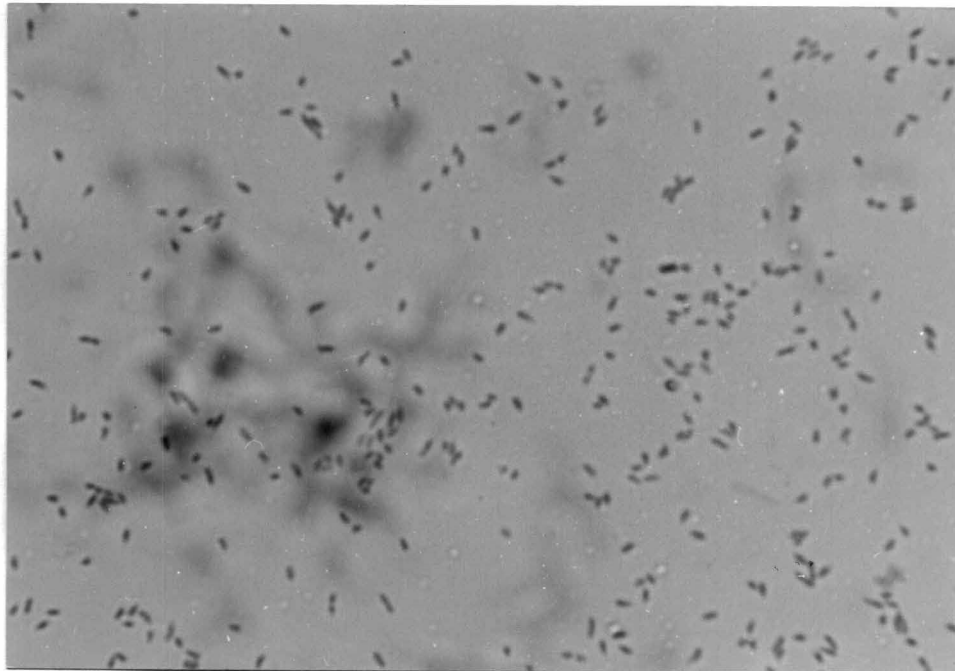


Gambar 2.3 Bentuk morfologi *Pseudomonas sp. 7* dengan pengecatan gram (pembesaran 1000x)

2.7.2 *Arthrobacter sp. 1*

Bentuk sel pada kultur yang baru adalah berbentuk batang yang tidak teratur, ukuran 0,8 – 1,2 x 1,0 – 8,0 μm , sering kali berbentuk huruf V dan membesar ujungnya. Diameter 0,6 – 1,0 μm , tersusun sendiri-sendiri atau berpasangan dan

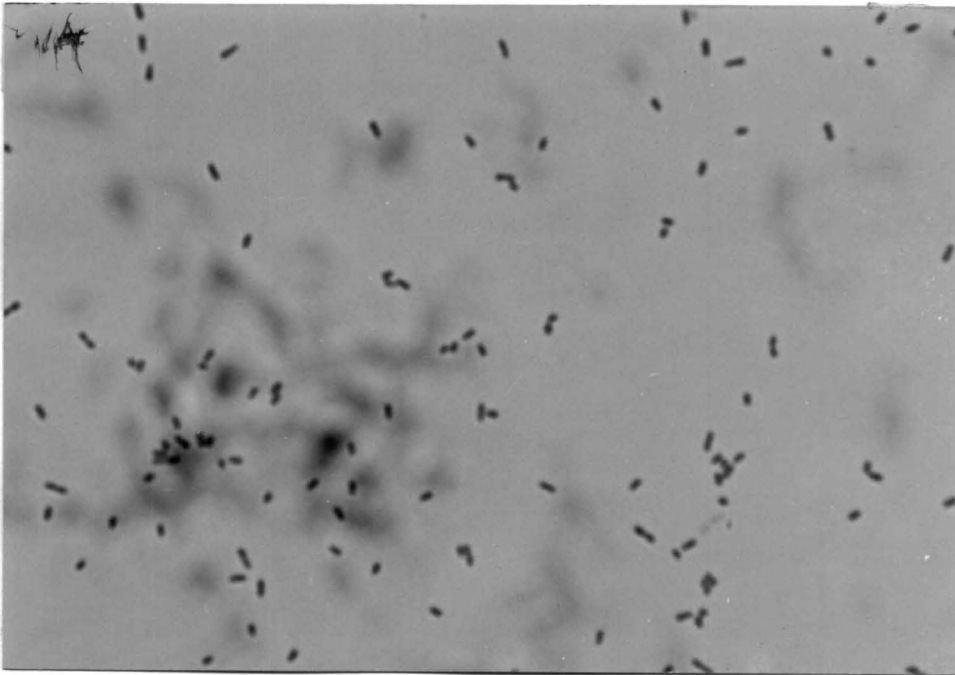
kelompok yang tidak teratur. Siklus pertumbuhan dari batang menjadi kokus adalah sifat khas dari *Arthrobacter*. Beberapa spesies motil, tidak berspora, aerobik dan tidak tahan asam. Temperatur pertumbuhan optimum adalah 25 – 30°C.



Gambar 2.4 Bentuk morfologi *Arthrobacter sp.1* dengan pewarnaan gram (pembesaran 1000x).

2.7.3 *Alcaligenes sp.1*

Berbentuk batang, kokoid sampai kokus, ukuran 0,5 – 1,0 x 0,5 – 2,0 µm. Umumnya tunggal, gram negatif, motil, memiliki 1 sampai 8 flagel, obligat aerob dan mempunyai temperatur optimum sekitar 20 – 37 °C.



Gambar 2.5. Bentuk morfologi *Alcaligenes sp.1* dengan pewarnaan gram (pembesaran 1000x)

Berbagai uji fisiologis dan nutrisi dari ketiga strain bakteri uji disajikan pada tabel 2.2. dibawah ini :

Tabel 2.2 Karakteristik fisiologis dan nutritif strain bakteri uji (Ni'matuzahroh,1999)

Uji Fisiologis	Jenis Strain		
	<i>Pseudomonas sp. 7</i>	<i>Arthrobacter sp. 1</i>	<i>Alcaligenes sp. 1</i>
Mac Conkey	+	+	+
Agar darah	++	+	++
Motilitas	+	+	+
Katalase	++	++	+
Oksidase	+	-	+
Koagulase	-	+	-
Glukosa	+	+	-
Sukrosa	+	+	-
Maltosa	+	+	-

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Bioremediasi merupakan salah satu upaya untuk mengurangi bahan pencemar dengan bantuan organisme hidup. Biodegradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme (bakteri dan jamur) telah diketahui sebagai mekanisme utama dalam proses eliminasi senyawa hidrokarbon di laut (Ni'matuzahroh, 1999). Salah satu faktor yang sering membatasi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon adalah sifat kelarutannya yang rendah, sehingga sulit mencapai sel mikroorganisme (Francy *et al.*, 1991).

Mikroorganisme mempunyai mekanisme tertentu untuk mengatasi kelarutan substrat hidrokarbon yang begitu rendah yaitu dengan mensekresikan senyawa yang bersifat *surface active* (biosurfaktan) ke dalam medium pertumbuhannya yang mengandung hidrokarbon (Zajic and Seffen, 1984; Neufeld *et al.*, 1983 dalam Francy *et al.*, 1991).

Biosurfaktan merupakan komponen mikroorganisme yang terdiri dari molekul-hidrofobik dan hidrofilik yang mampu mengikat molekul-molekul hidrokarbon yang tidak larut air dan mampu menurunkan tegangan permukaan kultur. Selain itu biosurfaktan secara ekstraseluler menyebabkan emulsifikasi hidrokarbon, sehingga mudah didegradasi (Koch *et al.*, 1991; Van Dyke *et al.*, 1993; Bertrand *et al.*, 1997).

Banyak mikroba diketahui menghasilkan biosurfaktan, terutama ketika ditumbuhkan pada substrat cair yang sukar larut. Menurut Guerra Santos *et al.*, 1984 dalam Carillo *et al.*, 1996, mikroorganisme dapat memproduksi biosurfaktan ketika ditumbuhkan pada substrat yang tidak larut (seperti hidrokarbon, minyak dan lilin) maupun pada substrat terlarut (karbohidrat). Pada *Pseudomonas sp.*, sumber karbon yang berbeda (seperti gliserol, glukosa dan etanol) dapat digunakan untuk produksi biosurfaktan, tapi produksi biosurfaktan pada ketiga substrat terlarut diatas masih lebih rendah bila dibandingkan dengan substrat n-alkana (contoh heksadekan) sebagai sumber karbonnya (Desai and Desai, 1993).

Haferberg *et al.* (1986) dan Guerra Santos *et al.* (1984) melaporkan bahwa mayoritas biosurfaktan disintesis oleh mikroorganisme yang ditumbuhkan pada hidrokarbon yang tidak larut dalam air, namun beberapa biosurfaktan juga diproduksi pada substrat larut seperti glukosa, gliserol dan etanol.

Disamping itu, banyak pula penelitian yang melaporkan adanya produksi biosurfaktan oleh bakteri ketika tumbuh dalam substrat glukosa. Dilaporkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu memproduksi surfaktin (jenis biosurfaktan) ketika ditumbuhkan dalam substrat glukosa (Desai and Desai, 1993)

Rasio C : N dalam medium juga sangat mempengaruhi produksi biosurfaktan, rasio C : N yang lebih tinggi pada substrat heksadekan, menyebabkan terbentuknya biosurfaktan (Guerra Santos *et al.*, 1984 dalam Desai and Desai, 1993).

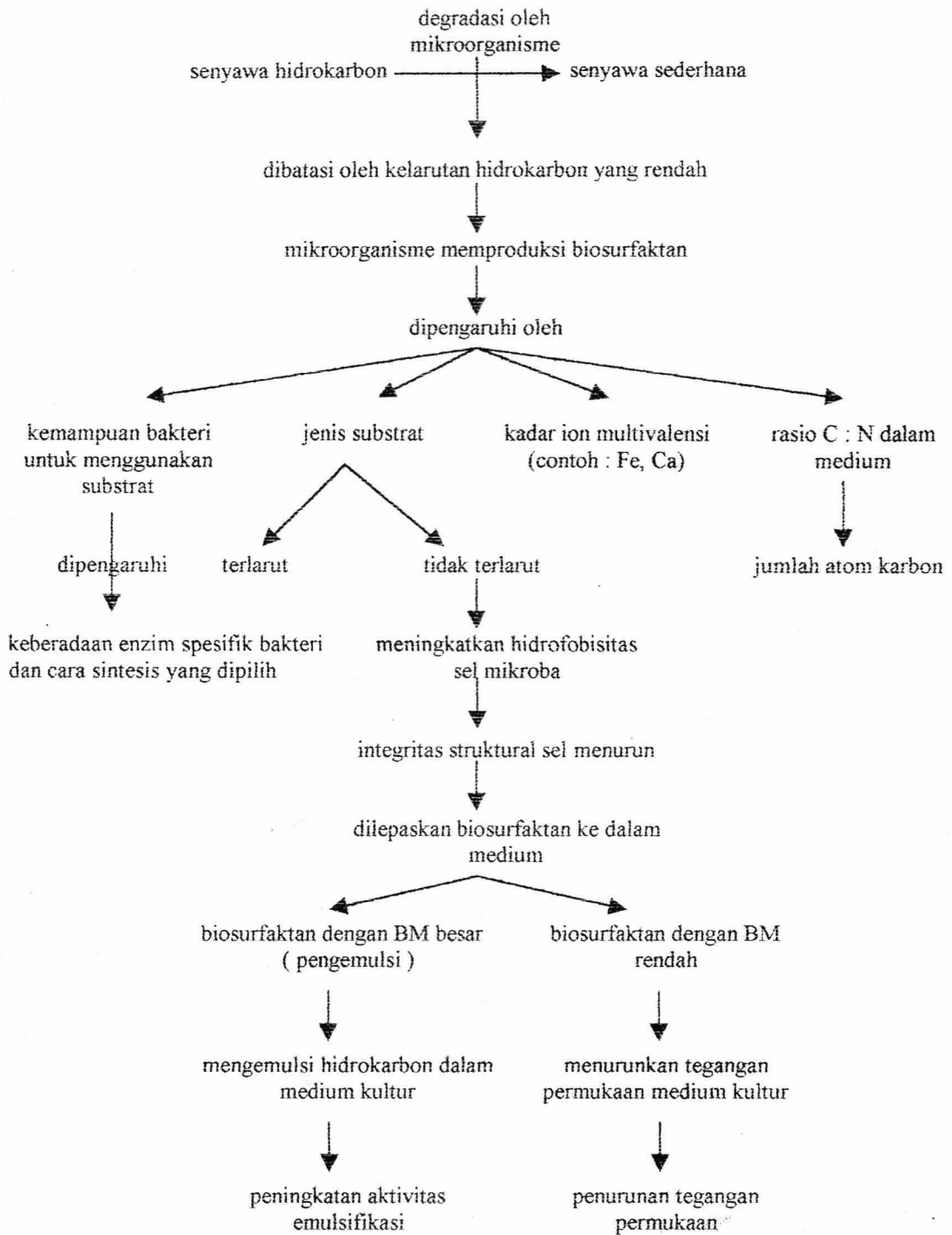
Disamping itu, kemampuan bakteri untuk menggunakan karbon dari substrat pertumbuhannya akan menentukan perubahan karbon tersebut ke dalam bentuk biosurfaktan. Terdapat tiga cara sintesis biosurfaktan yang mungkin terjadi bila

dihubungkan dengan substrat pertumbuhannya : 1. Sintesis bagian hidrofilik dan hidrofobik secara terpisah, kemudian kedua bagian tersebut mengalami penggabungan ke dalam bentuk molekul biosurfaktan yang lengkap. 2. Bakteri mensintesis bagian hidrofilik, sedang bagian hidrofobik yang terbentuk tergantung pada substrat pertumbuhannya, selanjutnya diikuti dengan penggabungan kedua bagian tersebut. 3. Bakteri mensintesis bagian hidrofobik, sedangkan bagian hidrofilik yang terbentuk tergantung pada substrat dan diikuti dengan penggabungan kedua bagian tersebut (Syldatk and Wagner, 1987 dalam Desai and Desai, 1993).

Desai and Desai (1993) menyatakan bahwa terdapat hubungan yang paralel antara penggunaan substrat oleh mikroba dan produksi biosurfaktan. Sumber karbon berperan penting dalam produksi biosurfaktan. Pada substrat hidrokarbon, panjang rantai hidrokarbon mempengaruhi produksi biosurfaktan (Syldatk *et al.*, 1985 dalam Desai and Desai, 1993).

Skrining mikroorganisme yang memproduksi biosurfaktan umumnya dilakukan dengan mengamati parameter-parameter yang menunjukkan aktivitas pada permukaan atau *Surface active*, seperti tegangan permukaan, tegangan antar permukaan dan kemampuannya dalam mengemulsi minyak atau hidrokarbon (Francy *et al.*, 1991 ; Cooper and Zajic, 1980).

Penurunan tegangan permukaan dan aktivitas emulsifikasi, digunakan sebagai suatu indikator tidak langsung adanya produksi biosurfaktan (Francy *et al.*, 1991). Di samping itu aktivitas hemolisis pada media agar darah juga digunakan sebagai suatu metode untuk menduga (prediksi awal) adanya produksi biosurfaktan oleh mikroorganisme (Carillo *et al.*, 1996).



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual penelitian

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang permasalahan, rumusan masalah, tinjauan pustaka serta kerangka konseptual penelitian, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Terdapat pengaruh jenis strain bakteri uji terhadap produksi biosurfaktan.
2. Terdapat pengaruh jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan yang dihasilkan oleh ketiga strain bakteri uji.
3. Terdapat pengaruh interaksi antara jenis strain bakteri uji dan jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris murni, menggunakan pola faktorial 3 x 3 dengan 5 ulangan.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi : Semua bakteri yang diisolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya yang telah ditumbuhkan pada substrat yang mengandung hidrokarbon (minyak) dan diduga memproduksi biosurfaktan.

Sampel : 3 strain bakteri yang lolos dalam uji pendugaan dalam memproduksi biosurfaktan (Hemolisis positif) yaitu *Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp.1* dan *Alcaligenes sp.1*. Isolat bakteri yang menunjukkan aktivitas hemolisis pada agar darah diduga memproduksi biosurfaktan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

Variabel bebas : Jenis bakteri, jenis substrat, kombinasi antara jenis bakteri dan jenis substrat. Bakteri yang digunakan ada 3 macam yaitu *Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1* dan *Alcaligenes sp.1*. Substrat yang digunakan adalah substrat terlarut

(ekstrak yeast + glukosa) dan substrat tidak terlarut yaitu senyawa hidrokarbon (heksadekan dan minyak pelumas).

Variabel tergantung : produksi biosurfaktan (berdasarkan nilai aktivitas emulsifikasi dan penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur).

Variabel kendali : Suhu, pH, waktu, kecepatan sentrifugasi, agitasi, komposisi media, cara pengukuran aktivitas emulsifikasi dan tegangan permukaan.

4.3.2 Definisi operasional variabel

Bakteri uji (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1*) merupakan strain bakteri yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Airlangga yang diisolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya dan diduga memproduksi biosurfaktan (uji hemolisis positif).

Substrat adalah sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri uji, dipilih tiga macam substrat yaitu campuran ekstrak yeast + glukosa (terlarut), dan dua macam substrat hidrokarbon sebagai medium tidak terlarut (heksadekan dan minyak pelumas).

Produksi biosurfaktan adalah biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri uji. Indikator tidak langsung adanya biosurfaktan adalah aktivitas emulsifikasi dan penurunan tegangan permukaan pada supernatan kultur bakteri. Aktivitas emulsifikasi adalah stabilitas emulsi yang didapatkan setelah agitasi campuran antara supernatan

kultur (yang mengandung biosurfaktan) dengan hidrokarbon. Adanya stabilitas emulsi dinyatakan dengan peningkatan nilai OD sampel dari OD kontrol.

Tegangan permukaan dinyatakan sebagai gaya per satuan panjang yang diperlukan untuk memperluas permukaan (dyne/cm).

4.4 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah 3 macam strain bakteri yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNAIR yang diisolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Bakteri yang akan diuji telah melewati tahap uji pendugaan memproduksi biosurfaktan (yaitu uji hemolisis positif). Bakteri-bakteri tersebut adalah *Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1*

2. Bahan kimia

- a. Substrat uji

Subtrat uji terdiri dari ekstrak yeast + glukosa, heksadekan (senyawa hidrokarbon tunggal) dan pelumas (senyawa hidrokarbon kompleks). Minyak pelumas yang digunakan adalah minyak pelumas kapal jenis MESRANIA SAE 40 yang diperoleh dari tempat penampungan (drum) pada salah satu kapal yang berlabuh di Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya.

b. Hidrokarbon untuk uji aktivitas emulsifikasi

Untuk uji aktivitas emulsifikasi digunakan tiga jenis senyawa hidrokarbon yaitu solar (diperoleh dari salah satu SPBU PERTAMINA), heksadekan, dan pelumas (bekas kapal, jenis MESRANIA SAE 40).

c. Lain - lain

Nutrien Broth, *Nutrient Agar*, NaCl, KCl, Tris, MgSO₄, NH₄Cl, FeSO₄, K₂HPO₄, CaCl₂, asam chromat dan aquades.

4.5 Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Autoclave Ogawa Seiki, tensiometer Du Nouy, spektrofotometer (spectronic 20), neraca analitik Shimadzu AEL-200, magnetic stirer MG-78-1, penangas air, vortex, shaker inkubator, sentrifuge, pH meter.
2. Erlenmeyer 100 ml dan 500 ml, pengaduk kaca, tabung reaksi, cawan petri, pipet 1 ml, 5 ml dan 10 ml, pembakar bunsen, jarum ose, aluminium foil, kapas, jarum spread, rak tabung, selotipe, tali, koran, gunting, gelas ukur, label, mikropipet 0,1 ml dan beaker glass.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya dari bulan Agustus sampai dengan Desember 2000.

4.7 Prosedur Pengumpulan Data

Prosedur pengumpulan data pada penelitian ini adalah terdiri dari beberapa tahapan, yaitu sebagai berikut :

1. Pembuatan media air laut sintetis

Air laut yang digunakan dalam penelitian ini adalah air laut sintetis (Gilewicz, 1997) yang merupakan media pertumbuhan bakteri. Air laut ini diperoleh dengan cara melarutkan NaCl (11,7 g/l), MgSO₄ (7,85 g/l), KCl (0,75 g/l), Tris (Hydroxy methyl amino methane) (4,00 g/l), NH₄Cl (3,00 g/l) ke dalam aquades. Kemudian ditambahkan CaCl₂ (1,47 g/l) yang terlebih dahulu dilarutkan dengan sedikit aquades, serta ditambah dengan FeSO₄ (0,10 mM) dan K₂HPO₄ (0,33 mM). Larutan dihomogenkan dengan menggunakan magnetik stirer dan diukur pH-nya. Dilakukan penambahan HCl pekat (37%) atau NaOH ke dalam larutan, sehingga diperoleh larutan dengan pH 7,00.

2. Pembuatan Stok Bakteri Uji

Biakan murni bakteri yang akan diuji (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1*) diperbanyak dalam media agar miring dan plate agar yang dibuat dengan melarutkan *Nutrient Agar* ke dalam air laut sintetis. Koloni yang tumbuh baik digunakan sebagai stok bakteri selama penelitian ini.

3. Perbanyak Bakteri dalam *Nutrient Broth*

Diambil satu koloni bakteri uji kemudian diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml media cair yang dibuat dengan melarutkan *Nutrient Broth*

(NB) dan air laut sintetis. Bakteri dalam kultur NB diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan penanaman ke dalam media prekultur bakteri.

4. Pembuatan Prekultur Bakteri

- a. Disiapkan 3 buah Erlenmeyer berukuran 100 ml untuk setiap strain bakteri. Masing-masing diisi dengan 25 ml air laut sintetis.
- b. Erlenmeyer I ditambah dengan 0,5 g/l ekstrak yeast dan 20 g/l glukosa, Erlenmeyer II ditambah dengan 20 g/l heksadekan dan Erlenmeyer III ditambah dengan 20 g/l minyak pelumas. Kemudian disterilkan dengan autoklave pada suhu 121°C selama 20 menit dan diinkubasi selama 24 jam.
- c. Ke dalam masing-masing Erlenmeyer di tambahkan 0.5 ml kultur bakteri yang ditumbuhkan dalam media NB (usia kultur 24 jam).
- d. Prekultur bakteri diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 30°C .
- e. Penanaman bakteri dari prekultur ke dalam kultur yang sesungguhnya dilakukan apabila OD prekultur telah mencapai $\geq 0,5$.

5. Pembuatan Kultur Bakteri

- a. Disiapkan 3 buah Erlenmeyer ukuran 500 ml untuk setiap strain bakteri. Masing-masing Erlenmeyer diisi dengan 150 ml air laut sintetis. Erlenmeyer I ditambah dengan 0,5 g/l ekstrak yeast dan 20 g/l glukosa. Erlenmeyer II ditambah dengan 20g/l glukosa dan Erlenmeyer III ditambah dengan 20 g/l minyak pelumas.
- b. Disterilkan dengan autoklave pada suhu 121°C selama 20 menit dan diinkubasi selama 24 jam.

- c. Ke dalam masing-masing Erlenmeyer ditambahkan 2% prekultur bakteri (2% dari volume media kultur yang digunakan) yang telah mencapai OD 0.5 ($\lambda = 610 \text{ nm}$)
 - d. Prekultur bakteri dengan nilai OD lebih besar dari 0,5 diencerkan dengan air laut sintetis sehingga mencapai OD =0,5
 - e. Kultur bakteri diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 30°C hingga mencapai fase stasioner. Kemudian dilakukan uji kemampuan ketiga strain bakteri dalam memproduksi biosurfaktan pada beberapa substrat pertumbuhan.
6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan bakteri
- a. Untuk mengamati pertumbuhan bakteri dilakukan tahapan kerja seperti pada pembuatan kultur bakteri. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan bersamaan dengan inkubasi kultur bakteri untuk uji produksi biosurfaktan.
 - b. Strain bakteri yang ditumbuhkan pada substrat glukosa dan ekstrak yeast, diamati pertumbuhannya setiap 4 jam sekali dengan menggunakan metode kerapatan optik (*Optical Density*).
 - c. Strain yang ditumbuhkan pada substrat hidrokarbon (heksadekan atau minyak pelumas) diamati pertumbuhannya setiap 2 hari sekali dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).
 - d. Nilai OD yang diperoleh diplotkan pada grafik fungsi waktu (jam) terhadap nilai absorbansi (610 nm). Sedangkan nilai TPC diubah terlebih dahulu dalam fungsi log sehingga diperoleh grafik fungsi waktu (hari) terhadap jumlah sel/ml (log).
 - e. Selanjutnya ditentukan waktu generasi dari masing-masing bakteri pada ketiga substrat pertumbuhan. Waktu generasi diperoleh dengan cara menghitung waktu

yang diperlukan oleh bakteri untuk menambah jumlah sel menjadi dua kali lipat dengan bantuan grafik logaritma.

7. Uji Produksi Biosurfaktan.

Kultur bakteri yang telah mencapai fase stasioner disentrifugasi pada 3333 rpm selama 33 menit untuk memisahkan sel dari supernatannya. Kultur yang akan disentrifugasi harus dipisahkan terlebih dulu dari minyak atau senyawa hidrokarbon yang ada di dalamnya. Produksi biosurfaktan diuji dengan mengukur aktivitas emulsifikasi supernatan kultur bakteri terhadap beberapa senyawa hidrokarbon (heksadekan, minyak pelumas dan minyak solar) dan mengukur tegangan permukaan supernatan kultur bakteri.

a. Pengukuran aktivitas emulsifikasi

Aktivitas emulsifikasi diukur dengan menggunakan metode Johnsons et al., (1992). Lima ml supernatan ditambah dengan 0,5 ml hidrokarbon (minyak pelumas, solar atau heksadekan). Setelah divortex selama 1 menit, campuran tersebut diukur kestabilan emulsinya dengan mengukur nilai OD setelah inkubasi selama 2 jam pada panjang gelombang 610 nm. Kontrol terdiri dari air laut sintetis dan senyawa hidrokarbon. Aktivitas emulsifikasi dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 5 ulangan. dan dinyatakan menurut rumus :

$$AE = ODS - ODC$$

$$AE = \text{Aktivitas emulsifikasi}$$

$$ODS = \text{OD emulsi supernatan dan senyawa hidrokarbon (pelumas/solar/heksadekan)}$$

ODC = OD emulsi kontrol (air laut sintetis dan pelumas/solar/heksadekan)

b. Pengukuran tegangan permukaan

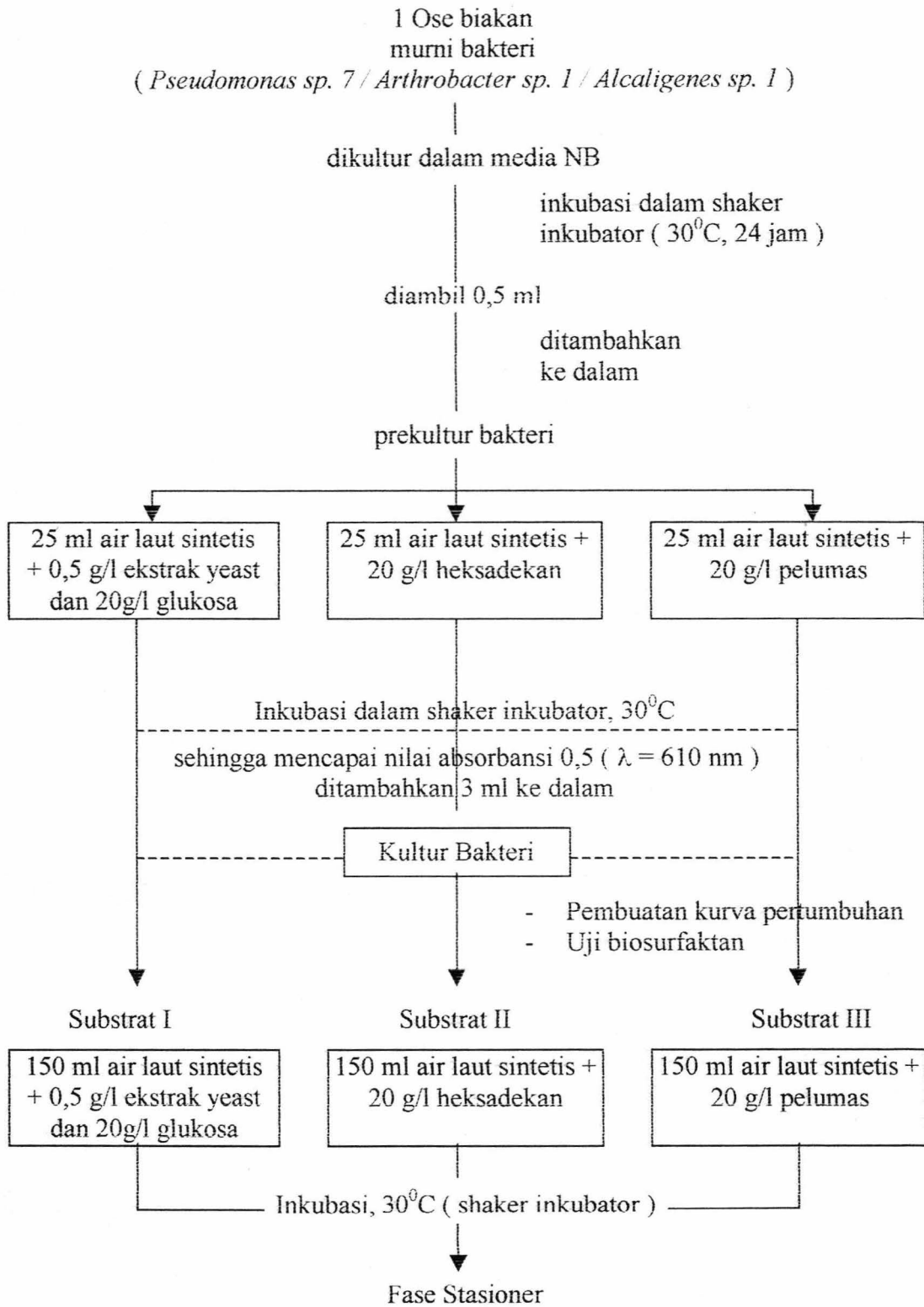
Supernatan kultur bakteri diukur nilai tegangan permukaannya dengan menggunakan alat tensiometer Du Nouy. Sebelum disentrifugasi, kultur bakteri yang baru dikeluarkan dari shaker inkubator, didiamkan selama 2 jam agar substrat hidrokarbon yang masih tersisa dalam kultur memisah. Lapisan hidrokarbon atau minyak yang terbentuk segera dibuang secara hati-hati. Kultur disentrifuge pada 3333 rpm selama 33 menit. Hasil sentrifugasi berupa pemisahan sel dengan supernatnya. Supernatan yang dihasilkan diambil 20 ml (pengambilan supernatan dilakukan secara hati-hati dan harus dipastikan bahwa tidak ada minyak maupun sel bakteri di dalamnya). Supernatan yang diperoleh dimasukkan ke dalam cawan petri yang bersih dan bebas lemak. Sebelum digunakan, cawan petri ini dicuci dengan larutan HCl 37 % yang telah diencerkan dengan aquades. Kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringanginkan.

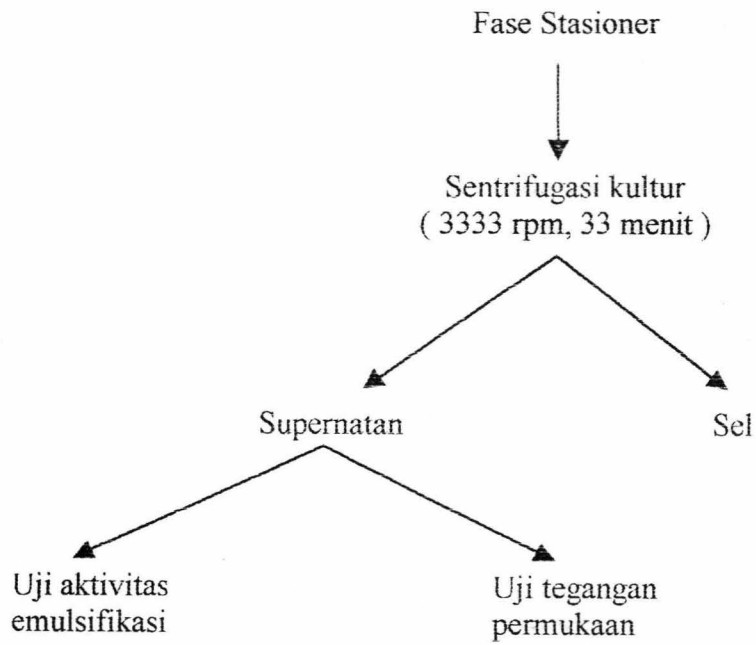
Selanjutnya dilakukan pengukuran tegangan permukaan supernatan kultur. Penurunan nilai tegangan permukaan sebesar lebih dari 10 dyne/cm menunjukkan kemungkinan besar bakteri tersebut menghasilkan biosurfaktan (Francy *et al.*, 1991). Nilai tegangan permukaan dinyatakan dalam dyne/cm dan dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 5 ulangan dengan menggunakan rumus :

$$r = r_0 \times \frac{\theta}{\theta_0}$$

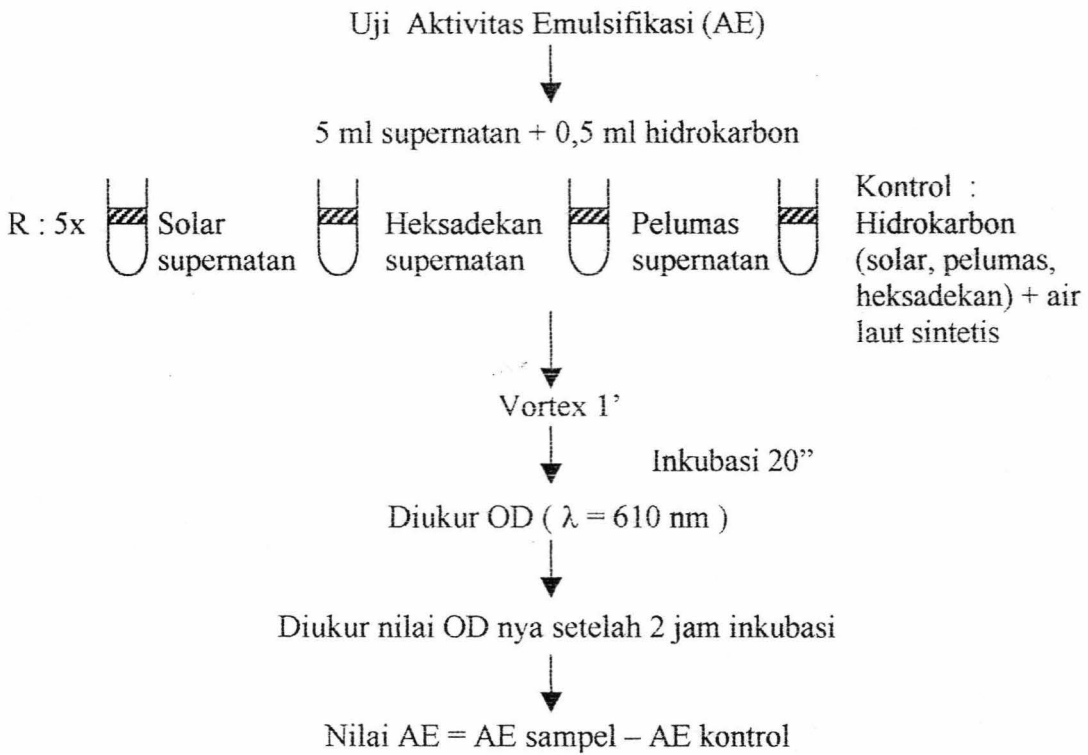
Keterangan :

- r = Tegangan permukaan sampel cair.
- r_0 = Tegangan permukaan air pada t °C
- θ = Tegangan permukaan sampel yang terbaca pada alat.
- θ_0 = Tegangan permukaan air yang terbaca pada alat.

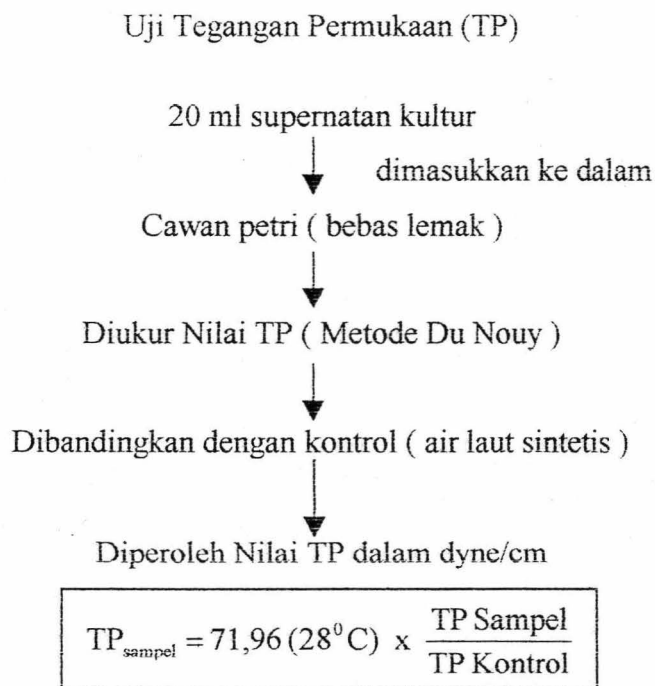




Gambar 4.1 Bagan alir prosedur penelitian



Gambar 4.2 Bagan alir tata cara pengukuran aktivitas emulsifikasi



Gambar 4.3 Bagan alir tata cara pengukuran tegangan permukaan

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa nilai rata-rata aktivitas emulsifikasi dan tegangan permukaan dari supernatan kultur masing-masing strain bakteri yang ditumbuhkan pada berbagai substrat. Data ditabulasikan ke dalam tabel 4.1 dan 4.2. Selanjutnya data dianalisis dengan analisis varian (Anava) dua arah dengan derajat signifikansi 5 %. Jika diperoleh nilai F_{hitung} lebih besar dari F_{tabel} maka analisis akan dilanjutkan dengan uji t.

Tabel 4.1 Nilai rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur bakteri pada beberapa substrat (nilai OD)

Jenis Bakteri	Ulangan	Jenis Substrat								
		Ekstrak yeast glukosa			Heksadekan			Pelumas		
		S	P	H	S	P	H	S	P	H
<i>Pseudomonas sp.7</i>	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
<i>Arthrobacter sp. 1</i>	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
<i>Alcaligenes sp. 1</i>	1									
	2									
	3									
	4									
	5									

Keterangan :

S = Solar

P = Pelumas

H = Heksadekan

Tabel 4.2 Nilai tegangan permukaan supernatan kultur beberapa bakteri pada beberapa substrat (dyne/cm)

Jenis Bakteri	Ulangan	Jenis Substrat		
		Ekstrak yeast glukosa	Heksadekan	Pelumas
<i>Pseudomonas sp. 7</i>	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
<i>Arthrobacter sp. 1</i>	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
<i>Alcaligenes sp. 1</i>	1			
	2			
	3			
	4			
	5			

BAB 5

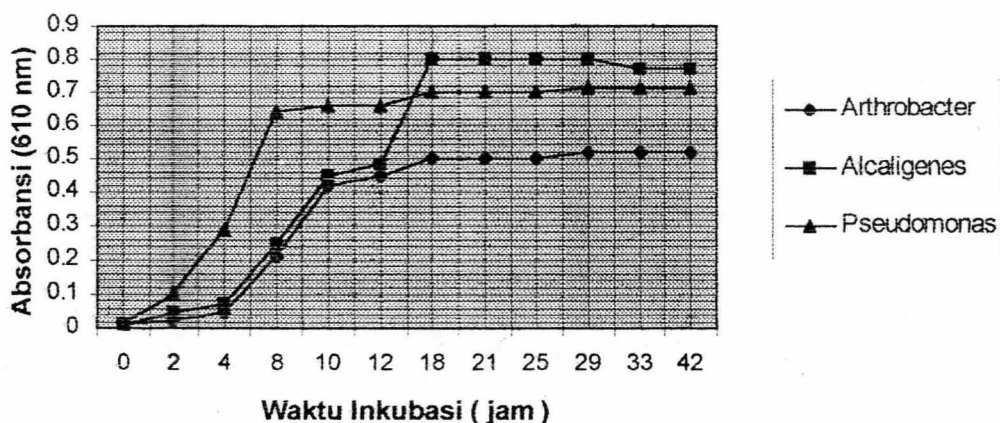
ANALISIS HASIL PENELITIAN

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa :

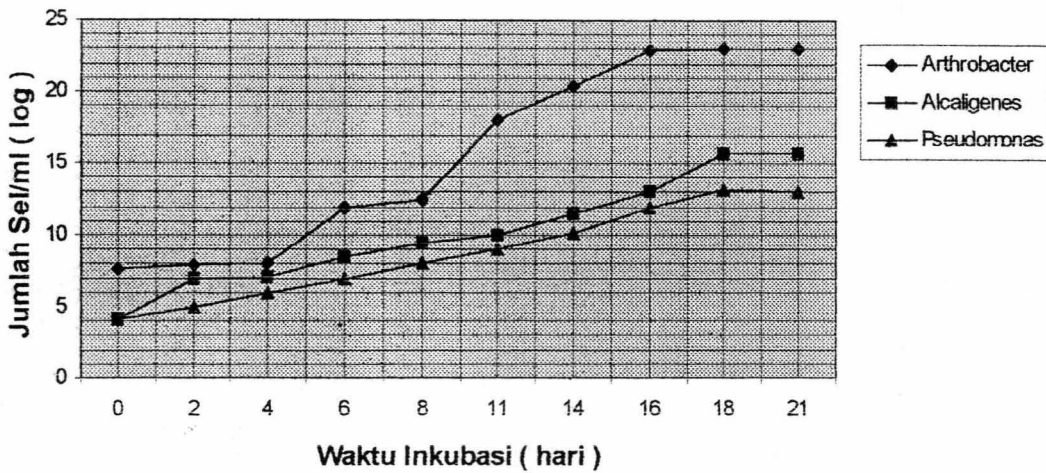
1. Kurva pertumbuhan ketiga bakteri uji dalam substrat uji (nilai absorbansi atau jumlah sel/ml per waktu inkubasi)
2. Waktu generasi bakteri uji ketika ditumbuhkan pada substrat berbeda.
3. Produksi biosurfaktan yang meliputi aktivitas emulsifikasi supernatan kultur pada tiga fraksi hidrokarbon (solar, pelumas, heksadekan) dan penurunan tegangan permukaan supernatan dari masing-masing kultur pada substrat berbeda.

5.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri

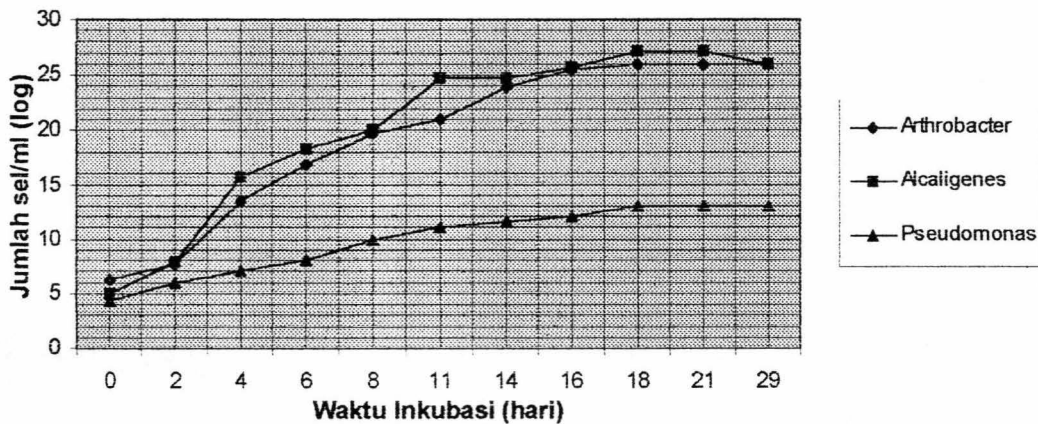
Kurva pertumbuhan ketiga strain bakteri uji pada tiga jenis substrat pertumbuhan disajikan pada gambar 5.1, 5.2, dan 5.3 berikut ini.



Gambar 5.1 Kurva pertumbuhan bakteri dalam substrat ekstrak yeast dan glukosa



Gambar 5.2 Kurva pertumbuhan bakteri dalam substrat heksadekan



Gambar 5.3 Kurva pertumbuhan bakteri dalam substrat pelumas

Pada gambar 5.1 dapat dilihat bahwa pada kultur glukosa + ekstrak yeast dengan umur kultur 42 jam, ketiga bakteri berada pada fase stasioner. Sedangkan pada kultur heksadekan dan minyak pelumas, fase stasioner masing-masing dicapai pada umur kultur 21 hari untuk heksadekan dan 29 hari untuk kultur pelumas. Grafik

di atas digunakan sebagai pedoman menentukan waktu untuk dilakukan uji. Dengan bantuan grafik logaritma, diperoleh waktu generasi dari masing-masing bakteri pada tiap-tiap substrat. Waktu generasi ketiga bakteri ditentukan untuk mengetahui kecepatan pembelahan dan respon masing-masing bakteri terhadap substrat. Hasil penghitungan disajikan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Waktu generasi bakteri uji pada beberapa substrat pertumbuhan

	Jenis Bakteri		
	<i>Pseudomonas sp. 7</i>	<i>Arthrobacter sp. 1</i>	<i>Alcaligenes sp. 1</i>
Ekstrak yeast + glukosa (jam)	1,5	1,9	2,2
Heksadekan (hari)	12,3	7,0	9,0
Pelumas (hari)	9,4	2,7	2,1

Dari tabel 5.1, dapat dilihat bahwa saat ketiga bakteri ditumbuhkan dalam substrat ekstrak yeast + glukosa, *Pseudomonas sp. 7* Mempunyai kecepatan pertumbuhan yang lebih tinggi dibanding kedua bakteri lainnya. Hal ini ditunjukkan oleh waktu generasi *Pseudomonas sp. 7* yang lebih singkat (1,5 jam) dibanding *Arthrobacter sp. 1* (1,9 jam) dan *Alcaligenes sp.1* (2,2 jam).

Sedangkan ketika ditumbuhkan dalam substrat heksadekan, *Arthrobacter sp1* memiliki kecepatan pertumbuhan tertinggi (dengan waktu generasi 7 hari) dibanding *Alcaligenes sp.1* (9 hari) dan *Pseudomonas sp.7* (12,3 hari). Pada substrat pelumas, *Alcaligenes sp.1* mempunyai kecepatan pertumbuhan tertinggi (2,1 hari) dibanding *Arthrobacter sp. 1*(2,7 hari) dan *Pseudomonas sp. 7* (9,4 hari).

Data produksi biosurfaktan oleh ketiga bakteri meliputi nilai rata-rata emulsifikasi dan nilai tegangan permukaan supernatan kultur.

5.2 Uji Aktivitas Emulsifikasi

Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi dari setiap perlakuan tertera pada tabel 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 dan 5.7. Sedangkan data asli penelitian disajikan pada lampiran 1 dan 2. Pada penelitian ini, jenis bakteri dan jenis substrat serta interaksi keduanya diteliti pengaruhnya terhadap aktivitas emulsifikasi. Data tersebut disajikan pada bagian A, B dan C di bawah ini.

A. Aktivitas emulsifikasi akibat perlakuan jenis bakteri

Tabel 5.2 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak **solar** dengan perlakuan jenis bakteri (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1*)

	Jenis Bakteri (A)		
	<i>Pseudomonas sp. 7</i>	<i>Arthrobacter sp. 1</i>	<i>Alcaligenes sp. 1</i>
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,017 ^a	0,041 ^b	0,017 ^a
Simpangan baku	0,010	0,021	0,010

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.3 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap minyak **pelumas** dengan perlakuan jenis bakteri (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1*) (Nilai OD)

	Jenis Bakteri (A)		
	<i>Pseudomonas sp. 7</i>	<i>Arthrobacter sp. 1</i>	<i>Alcaligenes sp. 1</i>
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,016 ^a	0,052 ^b	0,013 ^a
Simpangan baku	0,016	0,036	0,013

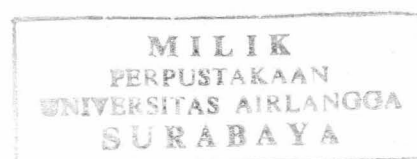
Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.4 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap **heksadekan** dengan perlakuan jenis bakteri (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1*) (Nilai OD)

	Jenis Bakteri (A)		
	<i>Pseudomonas sp. 7</i>	<i>Arthrobacter sp. 1</i>	<i>Alcaligenes sp. 1</i>
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,005 ^a	0,035 ^b	0,008 ^a
Simpangan baku	0,005	0,027	0,014

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Merujuk pada tabel 5.2, 5.3 dan 5.4 serta hasil analisis variansi (lampiran 3, 4 dan 5) diketahui bahwa jenis bakteri mempengaruhi aktivitas emulsifikasi supernatan kultur. Terlihat adanya perbedaan yang nyata antara ketiga jenis bakteri dalam mengemulsi hidrokarbon (solar, pelumas, dan heksadekan).



Arthrobacter sp. 1 menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibanding kedua bakteri lainnya. Aktivitas emulsifikasi *Arthrobacter sp.*1 terhadap solar, heksadekan dan pelumas, berturut-turut adalah 0,041; 0,052; dan 0,035. Nilai ini lebih tinggi dan berbeda nyata dibanding nilai aktivitas emulsifikasi yang dihasilkan oleh *Pseudomonas sp.* 7 (solar: 0,017 ; heksadekan: 0,016 dan pelumas: 0,005) dan *Alcaligenes sp.*7 (solar: 0,017 ; heksadekan: 0,013 ; pelumas: 0,014).

B. Aktivitas emulsifikasi akibat perlakuan jenis substrat

Hasil uji aktivitas emulsifikasi supernatan kultur dengan perlakuan jenis substrat berbeda dapat dilihat pada tabel 5.5, 5.6 dan 5.7 berikut ini.

Tabel 5.5 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap **minyak solar** dengan perlakuan jenis substrat (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan, pelumas) (Nilai OD)

	Jenis Substrat (B)		
	Ekstrak yeast + glukosa	Heksadekan	Pelumas
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,032 ^a	0,024 ^{ab}	0,019 ^b
Simpangan baku	0,015	0,024	0,012

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.6 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap **minyak pelumas** dengan perlakuan jenis substrat (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan, pelumas) (Nilai OD)

	Jenis Substrat (B)		
	Ekstrak yeast + glukosa	Heksadekan	Pelumas
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,040 ^a	0,036 ^a	0,005 ^b
Simpangan baku	0,015	0,041	0,005

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.7 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap **heksadekan** dengan perlakuan jenis substrat (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan, pelumas) (Nilai OD)

	Jenis Substrat (B)		
	Ekstrak yeast + glukosa	Heksadekan	Pelumas
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,016 ^a	0,021 ^a	0,011 ^a
Simpangan baku	0,016	0,033	0,012

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.5, 5.6 dan hasil analisis varians (lampiran 3 dan 4) menunjukkan bahwa hasil uji dengan menggunakan solar dan pelumas membuktikan bahwa terdapat pengaruh jenis substrat terhadap aktivitas emulsifikasi. Sedangkan hasil uji dengan menggunakan heksadekan (tabel 5.7) menunjukkan bahwa jenis substrat tidak

mempengaruhi aktivitas emulsifikasi supernatan kultur atau tidak ada beda nyata (lampiran 5).

Aktivitas emulsifikasi tertinggi diperoleh pada jenis substrat ekstrak yeast + glukosa (uji pada solar : 0,032 ; pelumas: 0,040) dan substrat heksadekan (uji pada solar : 0,024 ; pelumas : 0,036). Pengaruh kedua substrat ini tidak berbeda nyata. Aktivitas emulsifikasi terendah ditunjukkan oleh substrat pelumas (uji pada solar : 0,019 ; pelumas : 0,005).

C. Aktivitas emulsifikasi akibat kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat

Nilai rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi dengan kombinasi antara perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat tertera pada tabel 5.7, 5.8 dan 5.9.

Tabel 5.8 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap **minyak solar** dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat. (Nilai OD)

	Kombinasi Jenis Bakteri dan Jenis Substrat (AB)								
	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,026 ^a	0,012 ^a	0,014 ^a	0,050 ^c	0,050 ^c	0,022 ^a	0,020 ^a	0,009 ^b	0,022 ^a
Simpangan baku	0,009	0,008	0,009	0,007	0,023	0,016	0,007	0,007	0,011

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.9 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap **minyak pelumas** dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat. (Nilai OD)

	Kombinasi Jenis Bakteri dan Jenis Substrat (AB)								
	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,031 ^a	0,017 ^b	0,000 ^c	0,059 ^d	0,088 ^c	0,008 ^b	0,030 ^a	0,002 ^c	0,007 ^b
Simpangan baku	0,002	0,019	0,000	0,007	0,016	0,003	0,000	0,003	0,004

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.10 Rata-rata dan simpangan baku aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap **heksadekan** dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat. (Nilai OD)

	Kombinasi Jenis Bakteri dan Jenis Substrat (AB)								
	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃
Rata-rata aktivitas emulsifikasi (OD)	0,007 ^a	0,009 ^a	0,000 ^a	0,030 ^a	0,054 ^a	0,020 ^a	0,011 ^a	0,000 ^a	0,012 ^a
Simpangan baku	0,006	0,002	0,000	0,000	0,042	0,010	0,022	0,000	0,011

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Keterangan :

A₁B₁ = *Pseudomonas sp.* 7 dalam substrat ekstrak yeast + glukosa.

A₁B₂ = *Pseudomonas sp.* 7 dalam substrat heksadekan.

A₁B₃ = *Pseudomonas sp.* 7 dalam substrat minyak pelumas.

A₂B₁ = *Arthrobacter sp.* 1 dalam substrat ekstrak yeast + glukosa.

A₂B₂ = *Arthrobacter sp.* 1 dalam substrat heksadekan.

A_2B_3 = *Arthrobacter sp.* 1 dalam substrat minyak pelumas.

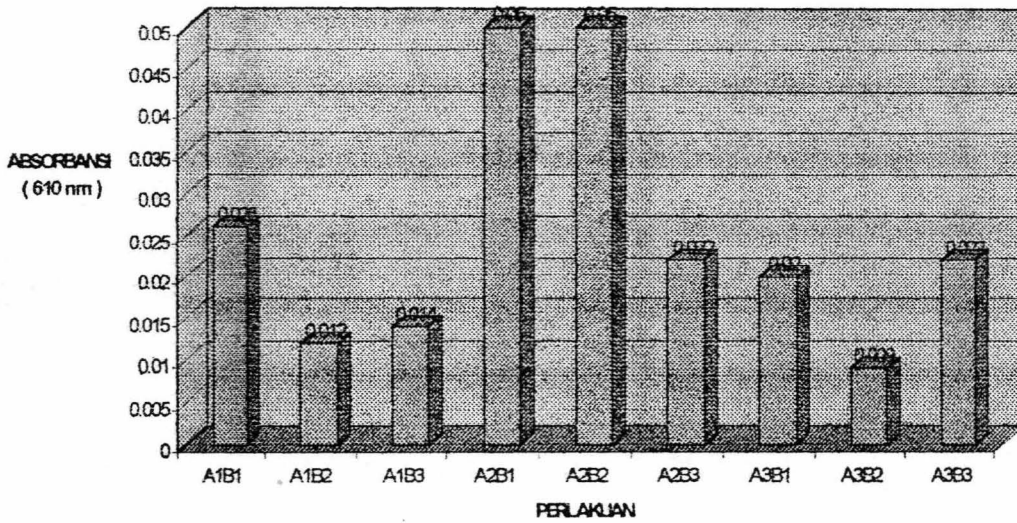
A_3B_1 = *Alcaligenes sp.* 1 dalam substrat ekstrak yeast + glukosa.

A_3B_2 = *Alcaligenes sp.* 1 dalam substrat heksadekan.

A_3B_3 = *Alcaligenes sp.* 1 dalam substrat minyak pelumas.

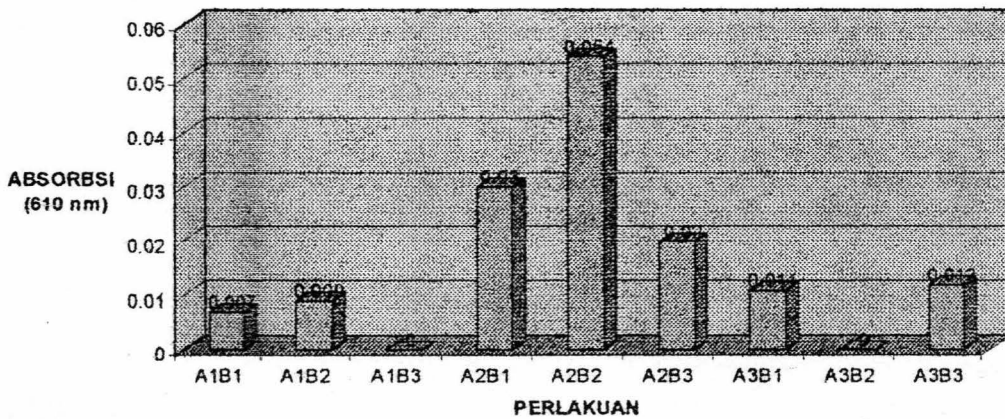
Hasil analisis variansi (lampiran 3 dan 4) menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat berpengaruh terhadap aktivitas emulsifikasi (Tabel 5.8 dan 5.9) ketika diuji dengan menggunakan minyak solar dan pelumas. Namun pengaruh interaksi kedua jenis perlakuan itu tidak tampak ketika diuji dengan heksadekan (Tabel 5.10 dan lampiran 5).

Uji aktivitas emulsifikasi dengan minyak solar menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi dimiliki oleh *Arthrobacter sp.* 1 yang ditumbuhkan dalam ekstrak yeast + glukosa (A_2B_1) yaitu sebesar 0,050 dan *Arthrobacter sp.* 1 yang ditumbuhkan dalam heksadekan (A_2B_2) yaitu 0,050 (gambar 5.4) sedangkan aktivitas terendah ditunjukkan oleh kombinasi *Alcaligenes sp.* 1 dalam substrat heksadekan (A_3B_2) yaitu sebesar 0,009.



Gambar 5.4 Rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap solar dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat

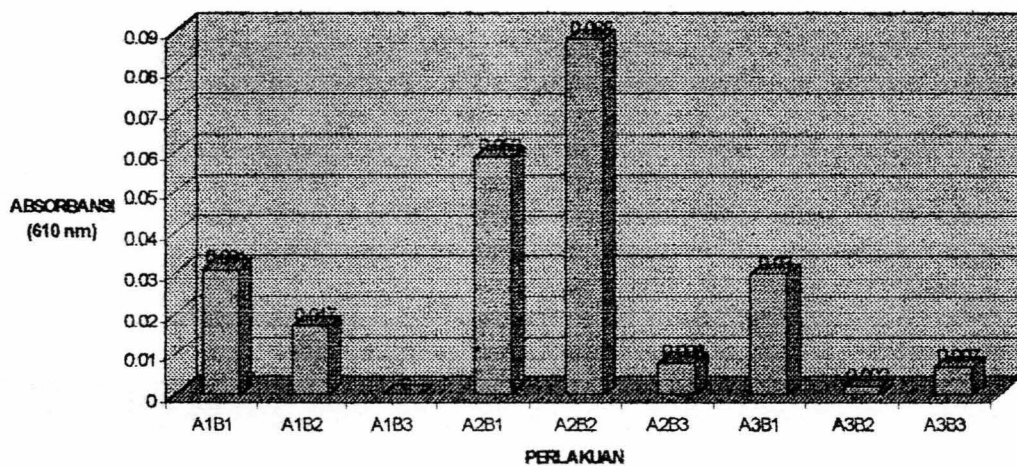
Keterangan : A₁B₁ = *Pseudomonas sp. 7* – Glukosa
 A₁B₂ = *Pseudomonas sp. 7* – Heksadekan
 A₁B₃ = *Pseudomonas sp. 7* – Pelumas
 A₂B₁ = *Arthrobacter sp. 1* – Glukosa
 A₂B₂ = *Arthrobacter sp. 1* – Heksadekan
 A₂B₃ = *Arthrobacter sp. 1* – Pelumas
 A₃B₁ = *Alcaligenes sp. 1* – Glukosa
 A₃B₂ = *Alcaligenes sp. 1* – Heksadekan
 A₃B₃ = *Alcaligenes sp. 1* – Pelumas



Gambar 5.5 Rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap heksadekan dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat

Gambar 5.5 menunjukkan bahwa aktivitas emulsifikasi tertinggi adalah kombinasi antara *Arthrobacter sp.1* dan substrat heksadekan (A2B2), namun dari analisis variansi diperoleh hasil bahwa tidak ada beda antar kombinasi perlakuan dalam mengemulsi heksadekan.

Uji dengan menggunakan pelumas menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi dihasilkan oleh *Arthrobacter sp.1* yang ditumbuhkan dalam substrat heksadekan (A₂B₂) yaitu sebesar 0,088. Aktivitas terendah ditunjukkan oleh *Pseudomonas sp. 7* yang ditumbuhkan dalam substrat pelumas (A₁B₃) yaitu sebesar 0,000 (gambar 5.6).



Gambar 5.6 Rata-rata aktivitas emulsifikasi supernatan kultur terhadap pelumas dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat

5.3 Uji Tegangan Permukaan

Rata-rata dan simpangan baku tegangan permukaan supernatan kultur bakteri *Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1* dalam substrat ekstrak

yeast + glukosa, heksadekan dan minyak pelumas tertera pada tabel 5.11, 5.12, dan 5.13.

Tabel 5.11 Rata-rata dan simpangan baku tegangan permukaan supernatan kultur dengan perlakuan **jenis bakteri** (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1*, dan *Alcaligenes sp. 1*) (dyne/cm)

	Jenis Bakteri (A)		
	<i>Pseudomonas sp. 7</i>	<i>Arthrobacter sp. 1</i>	<i>Alcaligenes sp. 1</i>
Rata-rata tegangan permukaan supernatan kultur (dyne/cm)	58,289 ^a	58,271 ^a	67,318 ^b
Simpangan baku	4,853	2,875	5,813

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.12 Rata-rata dan simpangan baku tegangan permukaan supernatan kultur dengan perlakuan **jenis substrat** (Ekstrak yeast + glukosa, heksadekan dan minyak pelumas) (dyne/cm)

	Jenis Substrat (B)		
	Ekstrak yeast + glukosa	Heksadekan	Pelumas
Rata-rata tegangan permukaan supernatan kultur (dyne/cm)	63,922 ^a	58,004 ^b	61,951 ^c
Simpangan baku	7,785	6,543	1,042

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.13 Rata-rata dan simpangan baku tegangan permukaan supernatan kultur dengan kombinasi perlakuan **jenis bakteri** dan **jenis substrat** (dyne/cm)

	Kombinasi Jenis Bakteri dan Jenis Substrat (AB)								
	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃
Rata-rata tegangan permukaan supernatan kultur (dyne/cm)	59,816 ^a	52,004 ^b	63,046 ^c	57,512 ^d	55,384 ^e	61,916 ^f	74,438 ^g	66,624 ^h	60,892 ⁱ
Simpangan baku	0,601	1,136	0,451	0,786	0,539	0,528	0,688	1,337	0,643

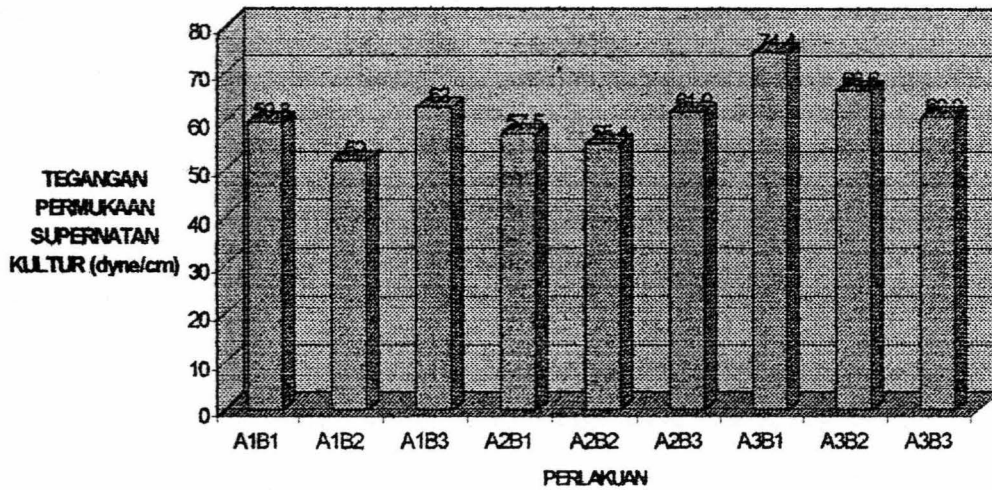
Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Hasil uji tegangan permukaan supernatan kultur, menunjukkan adanya pengaruh jenis bakteri terhadap penurunan nilai tegangan permukaan supernatan kultur (Tabel 5.11 dan lampiran 6). Nilai tegangan terendah dicapai oleh *Arthrobacter sp.* 1 (58,271 dyne/cm) dan *Pseudomonas sp.* 7 (58,289 dyne/cm), keduanya tidak berbeda nyata. Sedangkan nilai tegangan permukaan tertinggi dicapai oleh *Alcaligenes sp.* 1 (67,318 dyne/cm).

Jenis substrat juga mempengaruhi nilai tegangan permukaan supernatan kultur. Hal ini ditunjukkan pada tabel 5.12 dan lampiran 6. Tertera bahwa nilai tegangan permukaan terendah dihasilkan pada substrat heksadekan (58,004 dyne/cm), sedangkan nilai tertinggi pada substrat ekstrak yeast + glukosa (63,922 dyne/cm).

Kombinasi antara jenis substrat dan jenis bakteri juga menunjukkan hasil serupa yaitu terdapat perbedaan yang nyata antar kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat (Tabel 5.13 dan lampiran 4), hal ini berarti terdapat pengaruh interaksi antara jenis bakteri dan jenis substrat dalam menurunkan nilai tegangan permukaan supernatan kultur bakteri. Nilai tegangan permukaan terendah dicapai oleh kombinasi

antara *Pseudomonas sp.7* dalam heksadekan (A1B2) yaitu sebesar 52,004 dyne/cm (gambar 5.7).



Gambar 5.7 Rata-rata nilai tegangan permukaan supernatan kultur dengan kombinasi perlakuan jenis bakteri dan jenis substrat

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menguji kemampuan tiga strain bakteri yaitu *Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1* dan *Alcaligenes sp. 1* dalam menghasilkan biosurfaktan, serta untuk menguji hipotesis yang diajukan yang berbunyi 1. Terdapat pengaruh jenis bakteri terhadap produksi biosurfaktan, 2. Terdapat pengaruh jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan dan yang terakhir, 3. Terdapat pengaruh interaksi antara jenis bakteri dan jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan.

Uji kemampuan produksi biosurfaktan dilakukan terhadap 3 strain bakteri hasil isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya, dengan cara menumbuhkan pada 3 substrat berbeda. Pemilihan substrat didasarkan pada jenis senyawa (terlarut/tidak terlarut), serta bertujuan untuk mencari substrat terbaik dalam produksi biosurfaktan. Dalam penelitian ini digunakan substrat ekstrak yeast + glukosa (terlarut), heksadekan dan pelumas (tidak terlarut).

Respon bakteri terhadap ketiga substrat dapat dilihat pada grafik 5.1, 5.2 dan 5.3. Sedangkan kecepatan pertumbuhan berupa waktu generasi bakteri pada setiap substrat dapat dilihat pada tabel 5.1. Kurva pertumbuhan bakteri diikuti untuk menentukan fase stasioner dari setiap perlakuan substrat. Pemilihan fase tersebut didasarkan pada banyaknya penelitian yang mengamati adanya produksi biosurfaktan pada fase stasioner (Miguez, 1986; Patel and Desai, 1996; Koch et al., 1991; Desai and Desai, 1993).

pada fase stasioner (Miguez, 1986; Patel and Desai, 1996; Koch et al., 1991; Desai and Desai, 1993).

Dari grafik diketahui bahwa pada substrat terlarut (glukosa + ekstrak yeast), pertumbuhan stasioner pada ketiga strain bakteri dicapai pada waktu inkubasi 42 jam dengan strain *Pseudomonas sp. 7* mempunyai kecepatan pertumbuhan lebih bagus. Sedangkan pada substrat tidak larut, fase stasioner dicapai pada hari ke-21 (heksadekan) dan hari ke-29 (pelumas). Ternyata didapati waktu generasi ketiga strain bakteri pada substrat tidak larut lebih lama dibanding substrat terlarut. Hal tersebut berkaitan dengan ketersediaan substrat, dalam hal ini ketersediaan substrat karbon pada pelumas dan heksadekan lebih rendah dari glukosa. Ketersediaan substrat siap pakai yang rendah menjadikan bakteri hidrokarbonoklastik mempunyai waktu generasi yang lebih lama (Desai and Desai, 1993). Pada substrat heksadekan, *Arthrobacter sp. 1* mempunyai kecepatan pertumbuhan lebih bagus, sedangkan pada pelumas *Alcaligenes sp. 1* tumbuh lebih cepat.

Hasil analisis variansi (lampiran 3, 4 dan 5) menunjukkan bahwa jenis bakteri mempengaruhi produksi biosurfaktan. *Arthrobacter sp. 1* yang ditumbuhkan pada ketiga substrat menunjukkan emulsi tertinggi terhadap solar, pelumas maupun heksadekan. Selain itu, *Arthrobacter sp. 1* dan *Pseudomonas sp. 7* mampu menurunkan tegangan permukaan kultur sebesar 13,8 dyne/cm (72 dyne/cm menjadi 58,2 dyne/cm) dibanding kontrol pada ketiga substrat pertumbuhan. Menurut Francy et al.. (1991), penurunan nilai tegangan permukaan sebesar > 10 dyne/cm merupakan kriteria seleksi bakteri penghasil biosurfaktan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa *Arthrobacter sp. 1* dan *Pseudomonas sp. 7* mampu memproduksi biosurfaktan pada

ketiga susbtrat pertumbuhan. *Alcaligenes sp.* 1 menunjukkan aktivitas emulsifikasi yang rendah, dan hanya mampu menurunkan tegangan permukaan sebesar 4,7 dyne/cm. Sehingga *Alcaligenes sp.*1 dapat dikatakan memiliki kemampuan yang rendah dalam memproduksi biosurfaktan.

Kemampuan bakteri dalam memproduksi biosurfaktan berkaitan dengan keberadaan enzim regulatori yang berperan dalam sintesis biosurfaktan (Desai and Desai, 1993). Hal ini didukung oleh penelitian Mulligan *et al.* (1989) yang menunjukkan bahwa produksi surfaktin (jenis biosurfaktan) oleh *Bacillus subtilis* dipengaruhi oleh gen regulatori *com A*, *com P* dan *Spo OK*. Selain itu, Nakano and Zuber (1990) telah mengisolasi mutan *B. subtilis* dan menunjukkan bahwa dibutuhkan 3 lokus kromosom untuk mensintesis biosurfaktan (surfaktin).

Produksi biosurfaktan juga dipengaruhi oleh jenis substrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas emulsifikasi tertinggi diperoleh pada substrat ekstrak yeast + glukosa dan substrat heksadekan. Pada kedua substrat ini, aktivitas emulsifikasi yang dihasilkan dapat dilihat secara signifikan pada solar dan minyak pelumas. Namun tidak dapat diamati aktivitasnya pada heksadekan. Uji tegangan permukaan menunjukkan bahwa substrat heksadekan menunjukkan pengaruh signifikan dalam menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur yaitu sebesar 14 dyne/cm (72 dyne/cm menjadi 58,004 dyne/cm). Sedangkan ekstrak yeast + glukosa hanya mampu menurunkan 8 dyne/cm dan pelumas mampu menurunkan 10 dyne/cm.

Uraian di atas menunjukkan bahwa substrat ekstrak yeast + glukosa mampu meningkatkan aktivitas emulsifikasi supernatan kultur, namun pengaruhnya tidak nyata dalam menurunkan tegangan permukaan supernatan. Sedangkan substrat

heksadekan mampu meningkatkan aktivitas emulsifikasi dan menurunkan tegangan permukaan supernatan secara signifikan. Selanjutnya dapat disimpulkan bahwa substrat heksadekan menunjukkan pengaruh yang lebih baik terhadap produksi biosurfaktan oleh ketiga bakteri uji. Hal ini sesuai dengan kenyataan bahwa mayoritas bakteri hidrokarbonoklastik memproduksi biosurfaktan secara signifikan pada substrat yang mengandung hidrokarbon alifatik (Desai and Desai, 1993). Kenyataan ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Miguez and Ingram (1986) yang menumbuhkan *P. aeruginosa* pada substrat berbeda, yaitu glukosa dan heksadekan. Pertumbuhan *P. aeruginosa* pada substrat heksadekan menyebabkan selnya bersifat lebih hidrofob. Hidrofobisitas sel ini yang menyebabkan sel tersebut menunjukkan aktivitas emulsifikasi lebih baik dan mampu menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur secara signifikan dibanding sel yang ditumbuhkan pada substrat glukosa. Neufeld *et al.*, 1983 dalam Francy *et al.*, 1991 menegaskan bahwa pengaruh senyawa hidrokarbon pada komponen permukaan sel yang hidrofob dapat menyebabkan sel tersebut kehilangan integritas struktural selnya dan melepaskan biosurfaktan ke dalam medium.

Keberadaan ekstrak yeast dalam medium pertumbuhan juga mempengaruhi produksi biosurfaktan. Selain itu rasio C : N dalam medium juga sangat mempengaruhi produksi biosurfaktan (Desai and Desai, 1993). Hal ini sesuai dengan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, yaitu masing-masing substrat menunjukkan pengaruh yang berbeda-beda terhadap produksi biosurfaktan. Adanya perbedaan jumlah atom karbon pada substrat menyebabkan rasio C : N berbeda, sehingga diperoleh produksi biosurfaktan yang berbeda pula.

Kemampuan bakteri untuk menggunakan karbon dari substrat pertumbuhannya akan menentukan perubahan karbon tersebut dalam bentuk biosurfaktan. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri bisa saja berbeda kualitas maupun kuantitasnya ketika ditumbuhkan pada substrat yang berbeda, sehingga memberikan aktivitas emulsifikasi yang berlainan, serta perbedaan kemampuan dalam menurunkan tegangan permukaan kultur. Hal ini disebabkan oleh cara sintesis biosurfaktan yang berbeda, dan terkait dengan jenis substrat yang terdapat dalam medium pertumbuhannya (Desai and Desai, 1993). Terdapat tiga cara sintesis biosurfaktan yang mungkin terjadi bila dihubungkan dengan substrat pertumbuhannya : 1. Sintesis bagian hidrofilik dan hidrofobik secara terpisah, kemudian kedua bagian tersebut mengalami penggabungan ke dalam bentuk molekul biosurfaktan yang lengkap. 2. Bakteri mensintesis bagian hidrofilik, sedang bagian hidrofobik yang terbentuk tergantung pada substrat pertumbuhannya, selanjutnya diikuti dengan penggabungan kedua bagian tersebut. 3. Bakteri mensintesis bagian hidrofobik, sedangkan bagian hidrofilik yang terbentuk tergantung pada substrat dan diikuti dengan penggabungan kedua bagian tersebut (Syldatk and Wagner, 1987 dalam Desai and Desai, 1993).

Untuk mengetahui apakah *jenis bakteri* dan *jenis substrat* saling mempengaruhi terhadap produksi biosurfaktan, maka dilakukan analisis interaksi kedua variabel bebas diatas. Diperoleh hasil bahwa jenis bakteri dan jenis substrat saling berinteraksi dalam mempengaruhi produksi biosurfaktan. Uji aktivitas emulsifikasi terhadap **solar** menunjukkan bahwa kombinasi terbaik diperoleh pada kombinasi *Arthrobacter sp. 1* yang ditumbuhkan dalam ekstrak yeast + glukosa serta

Arthrobacter sp. 1 dalam heksadekan. Uji terhadap **pelumas** menunjukkan bahwa aktivitas emulsifikasi tertinggi hanya di tunjukkan oleh *Arthrobacter sp. 1* dalam heksadekan. Uji emulsifikasi dengan menggunakan **heksadekan**, menunjukkan tidak adanya pengaruh interaksi antara jenis bakteri dan jenis substrat dalam produksi biosurfaktan. Kemampuan menurunkan tegangan permukaan ditunjukkan oleh kombinasi *Pseudomonas sp. 7* dalam heksadekan (20 dyne/cm), kemudian diikuti oleh *Arthrobacter sp.1* dalam heksadekan (17 dyne/cm).

Penurunan tegangan permukaan sebesar 20 dan 17 dyne/cm yang dihasilkan, membuktikan bahwa kedua strain berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen penghasil biosurfaktan.

Arthrobacter sp.1 yang ditumbuhkan dalam heksadekan menunjukkan dua aktivitas sekaligus, yaitu aktivitas emulsifikasi dan penurunan tegangan permukaan kultur. Sedangkan *Pseudomonas sp. 7* dalam heksadekan hanya mampu menurunkan tegangan permukaan, sedangkan aktivitas emulsifikasinya rendah. Hal ini dapat dipahami sebab kemampuan yang berbeda dalam mengemulsi maupun menurunkan tegangan permukaan kultur bergantung pada jenis biosurfaktan yang dihasilkan.. Cooper *et al.*, 1986 dalam Willumsen and Karlson, 1997 membagi biosurfaktan menjadi dua kelompok yaitu **surfaktan dengan berat molekul rendah** (seperti glikolipid, soforolipid, trehalosalipid, asam lemak dan fosfolipid) yang terdiri dari molekul hidrofobik dan hidrofilik. Kelompok kedua adalah **polimer dengan berat molekul besar**, yang dikenal dengan *bioemulsifier* polisakarida amfifatik. Dalam medium cair, *bioemulsifier* ini mempengaruhi pembentukan emulsi serta kestabilannya dan tidak selalu menunjukkan penurunan tegangan permukaan

medium. Dari uraian diatas dapat disimpulkan bahwa dalam heksadekan, *Arthrobacter sp.1* mampu memproduksi biosurfaktan yang dapat mengemulsi (*emulsifier*) maupun menurunkan tegangan permukaan medium. Sedangkan *Pseudomonas sp. 7* memproduksi biosurfaktan yang bersifat hanya menurunkan tegangan permukaan dan tidak sebagai *emulsifier*.

Dari uraian diatas dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh jenis bakteri, jenis substrat, dan kombinasi antara jenis bakteri dan jenis susbtrat terhadap produksi biosurfaktan. *Arthrobacter sp. 1* dan *Pseudomonas sp. 7* mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agen penghasil biosurfaktan, sedang heksadekan merupakan substrat yang lebih baik dibanding substrat ekstrak yeast+ glukosa dan pelumas.

Pada penelitian ini, uji kemampuan produksi biosurfaktan oleh bakteri uji diamati hanya pada tiga macam substrat yaitu ekstrak yeast + glukosa, heksadekan dan pelumas. Hasil penelitian yang diperoleh mungkin berbeda apabila ketiga jenis bakteri ditumbuhkan dalam substrat pertumbuhan yang lain. Sehingga meskipun *Alcaligenes sp.1* memiliki kemampuan yang lebih rendah dibanding *Arthrobacter sp.1* dan *Pseudomonas sp. 7*, namun strain bakteri ini tetap perlu dikaji potensinya dalam memproduksi biosurfaktan, dengan menggunakan substrat-substrat lainnya, dan diperlukan penetapan komposisi medium pertumbuhan yang paling tepat, sehingga diperoleh biosurfaktan dengan kualitas dan kuantitas yang lebih baik. Demikian halnya dengan *Arthrobacter sp.1*, perlu dilakukan optimasi terhadap bakteri ini dalam memproduksi biosurfaktan. Optimasi dilakukan dengan mengubah-ubah rasio C:N:P serta faktor-faktor lingkungan lainnya yang berpengaruh terhadap aktivitas bakteri tersebut dalam memproduksi biosurfaktan. Selain itu perlu juga

dilakukan kombinasi substrat pertumbuhan, sebagai contoh kombinasi antara glukosa dengan heksadekan. Diharapkan nantinya diperoleh substrat yang murah dengan produksi biosurfaktan yang optimum.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil uji kemampuan ketiga strain bakteri (*Pseudomonas sp. 7*, *Arthrobacter sp. 1* dan *Alcaligenes sp. 1*) dalam memproduksi biosurfaktan dengan menggunakan tiga substrat yang berbeda, dapat disimpulkan beberapa hal berikut :

1. Jenis strain bakteri uji mempengaruhi produksi biosurfaktan. *Arthrobacter sp. 1* merupakan strain yang paling tinggi kemampuannya dalam memproduksi biosurfaktan.
2. Jenis substrat berpengaruh terhadap produksi biosurfaktan. Heksadekan merupakan substrat terbaik untuk produksi biosurfaktan.
3. Terdapat pengaruh interaksi antara jenis strain bakteri dan jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan (yang dinyatakan dengan nilai aktivitas emulsifikasi dan nilai tegangan permukaan supernatan kultur). Kombinasi antara *Arthrobacter sp.1* dalam heksadekan serta *Pseudomonas sp.7* dalam heksadekan menunjukkan potensi yang lebih tinggi dibanding kombinasi lainnya dalam memproduksi biosurfaktan.

7.2 Saran

Pada penelitian ini diperoleh hasil strain yang paling berpotensi dalam memproduksi biosurfaktan adalah *Arthrobacter sp.1* dan *Pseudomonas sp.7*, serta

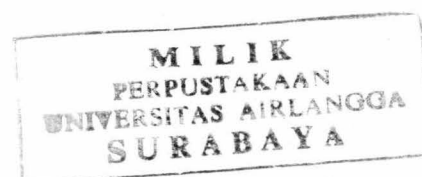
substrat heksadekan memberikan pengaruh yang lebih baik terhadap produksi biosurfaktan. Untuk itu perlu dilakukan optimasi produksi biosurfaktan pada *Arthrobacter sp. 1* dan *Pseudomonas sp.7* dalam substrat heksadekan, serta perlu dicari substrat lain yang lebih murah untuk produksi biosurfaktan dalam skala yang lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas RM, 1991. Microbal Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Oil Spil. *J Chem Tech Biotechnol* 52 : 149 – 156.
- Atlas RM, 1992. Petroleum Microbiology. *Encyclopedia of Microbiology*. Volume 3, Academic Press. Inc. California.
- Atlas RM, Richard B, 1993. *Microbial Ecology : Fundamental and Applications*. Third edition, Benjamin Inc. California. pp 393 – 398.
- Bertrand JC, Benin P, Goutx M, Gauthier M and Mile G, 1997. The Potential Application of Biosurfactants in Combatting Hydrocarbon Pollution in Marine Environments. *J Mar Biotechnology* pp 53 – 55.
- Buchanan, R.E and N.E. Gibbon, 1986, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition, W.B. The William and Wilkins Company, Baltimore.
- Carillo GG, Mardaraz C, Pitta –Alfarez, Guiliettu AM, 1996. Isolation and Selection of Biosurfactant Producing Bacteria. *Word J Microbiol and Biotechnol*. 12 : 82-84.
- Cirigliano MC and Carman GM, 1984. *Appl Environ Microbiol* 48 : 747
- Cooper DG, Mac Donald CR, Duff SJB and Kosaric N, 1981. *Appl Environ Microbiol* 42 : 408
- Cooper DG and Zajic JE, 1980. Surface Active Compounds from Microorganism. *Adv Appl Microbiol* 26 : 229 – 253.
- Cornel W dan Miller GJ, 1995. *Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran*. UI, Jakarta.
- Desai JD and Desai AJ, 1993. Production of Biosurfactants. In : *Biosurfactant : Production, Properties, Application*. N. Kosaric (ed), Marcel Dekker Inc. New York. pp 66-97.
- Francy DS, Thomas JM, Raymond RL and Ward CH, 1991. Emulsification of Hydrocarbons by Surface Bacteria. *J ind Microbiol* 8 : 234-246.

- Gerson DF, 1993. The Biophysics of Microbial Surfactants : Growth on Insoluble Substrates. In : *Biosurfactant : Production, Properties, Application*. N. Kosaric (ed), Marcel Dekker Inc. New York. pp 270-286.
- Gilewicz M, Ni'matuzahroh, Nadalig T, Budzinski H, Doumenq P, Michotey V and Bertrand JC, 1997. Isolation and Characterization of Marine Bacterium Capable of Utilizing 2- methyl phenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:528-533.
- Goswami P and Singh HD, 1990. The Effect of Immobilization on Rhamnolipid Production by *Pseudomonas fluorescens*. *J Appl Bacteriol*. University of Plymouth.
- Guerra Santos L, Kappeli O and Fiechter A, 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl environ Microbiol* 48 : 301-305.
- Haferberg D, Hommel R, Claus R, and Kleber HP, 1986. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv Biochem Engg* 33: 53-93
- Johnsons V, Sigh M, Saini VS, Andikari DK, Sista V and Yadav NK, 1992. Bioemulsifer Production Using Non Aseptic Fermentation of Mixed Cultures. *J Biotechnol and Bioeng* 44 : 661-666.
- Koch AK, Kappeli O, Fiechter A and Reiser J, 1991. Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa* Mutans. *J bacteriol*. Vol. 173. No. 13. United State of America.
- Lay BW dan Hastowo S, 1992. *Mikrobiologi* Rajawali Press. Jakarta.
- Mitchell R, 1974. *Introduction to Environmental Microbiology*. Prentice – Hall Inc. USA.
- Miguez CB and Ingram JM, 1986. *Can J Microbiol* 32 : 248-252.
- Mulligan CN, Chow TYK, and Gibbs BF, 1989. *Appl Microbiol Biotechnol* 31 : 486.
- Mursi S, Rochani NR, Rahartri, 1998. *Pemurnian Kembali Minyak Pelumas Bekas*, PDII, LIPI.
- Nakano MM and Zuber P, 1990. *CRC Crit Rev Biotechnol* 10 : 223.
- Ni'matuzahroh, 1999. Pencarian Strain Bakteri Hidrokarbonoklastik di Kawasan Perairan Pantai Surabaya. *Laporan Penelitian*. Lembaga Penelitian UNAIR. Surabaya.

- Neu TR and Poralla K, 1990. *Appl Microbiol Biotechnol* 32 : 521
- Persson A, Molin G, Andersson N and Sjöholm J, 1990. *Biotechnol Bioeng* 36 : 252
- Purwoko AA, Darwis AM, Fauzi and Mangunwidjaja D, 1997. Isolation of Biosurfactant – Producing Yeast from Oil. Contaminated Soil. *Proceedings of The Indonesian Conference*. pp 619 – 625.
- Rheinheimer G, 1980. *Aquatic Microbiology*. Second edition, John Wiley & Sons Ltd. USA. pp 150-151, 195-196.
- Richana N, Helena YM, Ani S, Tun Tedja I, 1998. Produksi Biosurfaktan Lipopeptida oleh Isolat Bakteri Indigenous. *Prosiding Seminar Pertemuan Ilmiah Tahunan : Peranan Mikrobiologi Dalam Agroindustri Untuk Menunjang Ketahanan Pangan Nasional* : 191-198.
- Roy PK, Singh HD, Bhagat SD and Baruah JN, 1979. Characterisation of Hidrokarbon Emulsification and Solubilisation Occuring Hydrocarbons. *Biotechnol Bioeng* 21 : 995 – 974.
- Semar, 1986. Pengaruh Kandungan Sulfur di dalam Bahan Bakar terhadap Emisi Gas SO₂ di Lingkungan dan Berbagai Pengaruhnya. *Lembaran Publikasi LEMIGAS*, No. 20.
- Van Dyke MI, Lee H and Trevors JT, 1991. Applications of Microbial Surfactant. *Biotechnol Adv* 9: 241-253.
- Van Dyke MI, Coutoure P, Brauer M, Lee H and Trevors JT, 1993. *Can J Microbial* 39 : 1071-1078.
- Velikonja J and Kosaric N, 1993. Biosurfactants in Food Application. in : *Biosurfactant : Production, Properties, Application*. N. Kosaric (ed), Marcel Dekker Inc., New York. pp 419-446.
- Willumsen PA, and Karlson U, 1997. Screening of Bacteria, Isolated from PAH Contaminated Soils, for Production of Biosurfactans dan Bioemulsifiers. *Biodegradation* 7 : 415-423.
- Zajic JE and Seffens W, 1984. Biosurfactants. *CRC Crit Rev Biotech* 1: 87-107.



LAMPIRAN 1 :

Nilai aktivitas emulsifikasi supernatan kultur masing-masing bakteri pada masing-masing substrat (Nilai OD 610 nm)

Jenis Bakteri	Ulangan	Jenis Substrat								
		Ekstrak yeast + glukosa			Pelumas			Heksadekan		
		S	P	H	S	P	H	S	P	H
<i>Pseudomonas sp. 7</i>	1	0,030	0,030	0,015	0,000	0,000	0,000	0,020	0,010	0,005
	2	0,040	0,035	0,012	0,020	0,000	0,000	0,020	0,005	0,010
	3	0,020	0,030	0,005	0,010	0,000	0,000	0,0100	0,010	0,010
	4	0,020	0,030	0,005	0,020	0,000	0,000	0,010	0,050	0,010
	5	0,020	0,030	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,010	0,010
<i>Arthrobacter sp. 1</i>	1	0,050	0,060	0,030	0,010	0,005	0,010	0,050	0,100	0,030
	2	0,050	0,060	0,030	0,020	0,010	0,030	0,090	0,070	0,020
	3	0,060	0,055	0,030	0,020	0,005	0,020	0,040	0,080	0,020
	4	0,040	0,050	0,030	0,010	0,010	0,010	0,030	0,080	0,100
	5	0,050	0,070	0,030	0,050	0,010	0,030	0,040	0,110	0,100
<i>Alcaligenes sp. 1</i>	1	0,020	0,030	0,050	0,020	0,010	0,005	0,010	0,000	0,000
	2	0,030	0,030	0,000	0,020	0,010	0,005	0,005	0,000	0,000
	3	0,020	0,030	0,000	0,010	0,000	0,015	0,000	0,005	0,000
	4	0,010	0,030	0,005	0,020	0,005	0,030	0,020	0,000	0,000
	5	0,020	0,030	0,000	0,040	0,010	0,005	0,010	0,005	0,000

Keterangan :

S = Solar

P = Pelumas

H = Heksadekan

LAMPIRAN 2 :

Nilai tegangan permukaan supernatan beberapa bakteri yang ditumbuhkan pada beberapa substrat (dyne/cm)

Jenis Bakteri	Ulangan	Jenis Substrat		
		Ekstrak yeast + glukosa	Heksadekan	Pelumas
<i>Pseudomonas sp. 7</i>	1	59,34	52,70	62,59
	2	59,34	50,20	63,60
	3	60,59	52,96	63,35
	4	59,47	51,58	62,59
	5	60,34	52,58	63,10
	x	59,82	52,00	63,05
<i>Arthrobacter sp. 1</i>	1	58,34	56,34	62,34
	2	56,46	55,21	61,34
	3	56,96	55,08	61,34
	4	57,71	55,21	62,22
	5	58,09	55,08	62,34
	x	57,51	55,38	61,92
<i>Alcaligenes sp. 1</i>	1	73,99	65,10	60,84
	2	73,99	65,22	61,97
	3	75,36	67,60	60,84
	4	74,99	67,60	60,47
	5	73,86	67,60	60,34
	x	74,34	66,63	60,89

LAMPIRAN 3 :

Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi Jenis bakteri dan jenis substrat terhadap aktivitas emulsifikasi pada solar

**** TABEL RANGKUMAN ANALISIS VARIANSI 2-JALUR**

Sumber	JK	db	RK	F	R ²	p
Antar A	0.006	2	0.003	18.758	0.381	0.000
Antar B	0.001	2	0.001	4.223	0.086	0.022
Inter AB	0.002	4	0.001	4.132	0.168	0.008
Dalam	0.005	36	0.000	--	--	--
Total	0.015	44	--	--	--	--

**** UJI-t ANTAR B**

Sumber	X
B1-B2	1.881
p	0.065
B1-B3	2.859
p	0.007
B2-B3	0.978
p	0.664

p = dua-ekor.

**** UJI-t ANTAR A**

Sumber	X
A1-A2	-5.266
p	0.000
A1-A3	0.075
p	0.939
A2-A3	5.342
p	0.000

p = dua-ekor.

Keterangan :

- A : Jenis bakteri
- B : Jenis substrat
- AB : Kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat

**** MATRIKS UJI-t INTER AB**

A,B	1,1	1,2	1,3	2,1	2,2	2,3	3,1	3,2	3,3
1,1	0.000	1.824	1.564	-3.127	-3.127	0.521	0.782	2.215	0.521
p	1.000	0.073	0.123	0.004	0.004	0.611	0.555	0.031	0.611
1,2	-1.824	0.000	-0.261	-4.952	-4.952	-1.303	-1.042	0.391	-1.303
p	0.073	1.000	0.792	0.000	0.000	0.198	0.305	0.700	0.198
1,3	-1.564	0.261	0.000	-4.691	-4.691	-1.042	-0.782	0.652	-1.042
p	0.123	0.792	1.000	0.000	0.000	0.305	0.555	0.526	0.305
2,1	3.127	4.952	4.691	0.000	-0.000	3.649	3.909	5.343	3.649
p	0.004	0.000	0.000	1.000	0.996	0.001	0.001	0.000	0.001
2,2	3.127	4.952	4.691	0.000	0.000	3.649	3.909	5.343	3.649
p	0.004	0.000	0.000	0.996	1.000	0.001	0.001	0.000	0.001
2,3	-0.521	1.303	1.042	-3.649	-3.649	0.000	0.261	1.694	0.000
p	0.611	0.198	0.305	0.001	0.001	1.000	0.792	0.095	0.996
3,1	-0.782	1.042	0.782	-3.909	-3.909	-0.261	0.000	1.433	-0.261
p	0.555	0.305	0.555	0.001	0.001	0.792	1.000	0.157	0.792
3,2	-2.215	-0.391	-0.652	-5.343	-5.343	-1.694	-1.433	0.000	-1.694
p	0.031	0.700	0.526	0.000	0.000	0.095	0.157	1.000	0.095
3,3	-0.521	1.303	1.042	-3.649	-3.649	-0.000	0.261	1.694	0.000
p	0.611	0.198	0.305	0.001	0.001	0.996	0.792	0.095	1.000

p = dua-ekor.

LAMPIRAN 4 :

Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat terhadap aktivitas emulsifikasi pada pelumas

**** TABEL RANGKUMAN ANALISIS VARIANSI 2-JALUR**

Sumber	JK	db	RK	F	R ²	p
Antar A	0.014	2	0.007	87.979	0.368	0.000
Antar B	0.011	2	0.005	69.218	0.289	0.000
Inter AB	0.010	4	0.003	32.077	0.268	0.000
Dalam	0.003	36	0.000	--	--	--
Total	0.038	44	--	--	--	--

**** UJI-t ANTAR A**

Sumber	X
A1-A2	-10.997
p	0.000
A1-A3	0.925
p	0.636
A2-A3	11.922
p	0.000

p = dua-ekor.

**** UJI-t ANTAR B**

Sumber	X
B1-B2	1.336
p	0.187
B1-B3	10.792
p	0.000
B2-B3	9.456
p	0.000

p = dua-ekor.

Keterangan :

- A : Jenis bakteri**
- B : Jenis substrat**
- AB : Kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat**

**** MATRIKS UJI-t INTER AB**

A,B	1,1	1,2	1,3	2,1	2,2	2,3	3,1	3,2	3,3
1,1	0.000	2.492	5.519	-4.984	-10.147	4.094	0.178	5.162	4.272
p	1.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.854	0.000	0.000
1,2	-2.492	0.000	3.026	-7.477	-12.639	1.602	-2.314	2.670	1.780
p	0.017	1.000	0.005	0.000	0.000	0.114	0.025	0.011	0.080
1,3	-5.519	-3.026	0.000	-10.503	-15.666	-1.424	-5.341	-0.356	-1.246
p	0.000	0.005	1.000	0.000	0.000	0.160	0.000	0.724	0.219
2,1	4.984	7.477	10.503	0.000	-5.162	9.079	5.162	10.147	9.257
p	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2,2	10.147	12.639	15.666	5.162	0.000	14.241	10.325	15.309	14.419
p	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2,3	-4.094	-1.602	1.424	-9.079	-14.241	0.000	-3.916	1.068	0.178
p	0.000	0.114	0.160	0.000	0.000	1.000	0.001	0.293	0.854
3,1	-0.178	2.314	5.341	-5.162	-10.325	3.916	0.000	4.984	4.094
p	0.854	0.025	0.000	0.000	0.000	0.001	1.000	0.000	0.000
3,2	-5.162	-2.670	0.356	-10.147	-15.309	-1.068	-4.984	0.000	-0.890
p	0.000	0.011	0.724	0.000	0.000	0.293	0.000	1.000	0.617
3,3	-4.272	-1.780	1.246	-9.257	-14.419	-0.178	-4.094	0.890	0.000
p	0.000	0.080	0.219	0.000	0.000	0.854	0.000	0.617	1.000

p = dua-ekor.

LAMPIRAN 5 :

Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat terhadap aktivitas emulsifikasi pada heksadekan

**** TABEL RANGKUMAN ANALISIS VARIANSI 2-JALUR**

Sumber	JK	db	RK	F	R ²	p
Antar A	0.008	2	0.004	14.158	0.365	0.000
Antar B	0.001	2	0.000	1.431	0.037	0.251
Inter AB	0.003	4	0.001	2.611	0.135	0.051
Dalam	0.010	36	0.000	--	--	--
Total	0.022	44	--	--	--	--

**** UJI-t ANTAR A**

Sumber	X
A1-A2	-4.778
p	0.000
A1-A3	-0.360
p	0.721
A2-A3	4.418
p	0.000

=====
p = dua-ekor.

Keterangan :

A : Jenis bakteri
B : Jenis substrat
AB : Kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat

LAMPIRAN 6 :

Hasil analisis variansi dua jalur pengaruh jenis bakteri, jenis substrat dan kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat terhadap nilai tegangan permukaan supernatan kultur

**** TABEL RANGKUMAN ANALISIS VARIANSI 2-JALUR**

Sumber	JK	db	RK	F	R ²	p
Antar A	816.917	2	408.458	643.146	0.471	0.000
Antar B	272.438	2	136.219	214.486	0.157	0.000
Inter AB	623.204	4	155.801	245.319	0.359	0.000
Dalam	22.863	36	0.635	--	--	--
Total	1,735.422	44	--	--	--	--

**** UJI-t ANTAR A**

**** UJI-t ANTAR B**

Sumber	X	Sumber	X
A1-A2	0.062	B1-B2	20.337
p	0.950	p	0.000
A1-A3	-31.029	B1-B3	6.772
p	0.000	p	0.000
A2-A3	-31.091	B2-B3	-13.565
p	0.000	p	0.000

Keterangan :

A : Jenis bakteri

B : Jenis substrat

AB : Kombinasi jenis bakteri dan jenis substrat

p = dua-ekor.

p = dua-ekor.

**** MATRIKS UJI-t INTER AB**

A,B	1,1	1,2	1,3	2,1	2,2	2,3	3,1	3,2	3,3
1,1	0.000	15.499	-6.408	4.571	8.793	-4.166	-29.011	-13.507	-2.135
p	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037
1,2	-15.499	0.000	-21.908	-10.928	-6.706	-19.666	-44.510	-29.007	-17.634
p	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1,3	6.408	21.908	0.000	10.980	15.202	2.242	-22.602	-7.099	4.274
p	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000
2,1	-4.571	10.928	-10.980	0.000	4.222	-8.738	-33.582	-18.079	-6.706
p	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2,2	-8.793	6.706	-15.202	-4.222	0.000	-12.960	-37.804	-22.301	-10.928
p	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2,3	4.166	19.666	-2.242	8.738	12.960	0.000	-24.844	-9.341	2.032
p	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.047
3,1	29.011	44.510	22.602	33.582	37.804	24.844	0.000	15.503	26.876
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
3,2	13.507	29.007	7.099	18.079	22.301	9.341	-15.503	0.000	11.373
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
3,3	2.135	17.634	-4.274	6.706	10.928	-2.032	-26.876	-11.373	0.000
p	0.037	0.000	0.000	0.000	0.000	0.047	0.000	0.000	1.000

p = dua-ekor.