

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian mengenai kelarutan *oil sludge* dengan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan variasi konsentrasi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B dilakukan dengan tiga tahapan pokok. Tahapan awal yang dilakukan adalah proses produksi biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) untuk mendapatkan produk biosurfaktan, selanjutnya tahapan produksi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B, dan tahapan terakhir adalah tahapan uji kelarutan *oil sludge* dengan biosurfaktan dan variasi konsentrasi *crude* enzim lipase.

Data yang diperoleh dari penelitian kelarutan *oil sludge* dengan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan variasi konsentrasi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B adalah sebagai berikut:

1. Karakteristik supernatan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1) sebagai penghasil biosurfaktan yang terdiri dari:
 - a. Nilai tegangan permukaan supernatan kultur yang telah diinkubasi selama 3 hari. Tegangan permukaan yang diperoleh memiliki satuan dyne/cm.
 - b. Nilai aktivitas emulsifikasi supernatan kultur yang telah diinkubasi selama 3 hari, menggunakan minyak uji solar. Aktivitas emulsifikasi dilihat pada saat 1 jam dan 24 jam inkubasi dan dinyatakan dalam persen (%).

- c. Nilai berat kering kasar biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) hasil ekstraksi dan nilai konsentrasi sama dengan CMC dari biosurfaktan.
2. *Crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B dihitung nilai aktivitas enzimnya. Proses produksi *crude* enzim lipase diusahakan berada dalam nilai aktivitas tertingginya untuk memproduksi enzim lipase, sehingga produk yang dihasilkan juga maksimal. Selain itu ditampilkan pula nilai *optical density* (OD) kultur *Bacillus sp.* LII63B sebagai nilai untuk kurva pertumbuhan selama proses uji. Selanjutnya *crude* enzim lipase yang didapatkan juga di lihat kemampuannya dengan menghitung nilai tegangan permukaannya (dyne/cm) dan persentase nilai aktivitas emulsifikasi (%).
3. Nilai kelarutan *oil sludge* dengan menggunakan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B. Nilai kelarutan diperoleh dari perbandingan berat *oil sludge* yang terfiltrasi pada kertas saring Whatman setelah perlakuan dengan berat awal *oil sludge*.

Uraian tentang masing-masing hasil dari tahapan penelitian ini disajikan dan dibahas secara berurutan sebagai berikut:

4.1 Karakterisasi Biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1)

Produksi biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) diproduksi menggunakan media air mineral sintetik (AMS) yang ditambahkan substrat molase sebanyak 4%. Molase berperan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan bakteri. Selain itu, penggunaan molase sebagai substrat karena merupakan limbah dari pabrik tebu serta harganya yang relatif terjangkau. Tahapan uji karakteristik supernatan

kultur terdiri dari perhitungan tegangan permukaan (dyne/cm) dan nilai aktivitas emulsifikasi selama 1 jam dan 24 jam inkubasi (%). Proses ekstraksi supernatan kultur biosurfaktan dilakukan untuk mendapatkan produk kasarnya dan ditentukan nilainya dengan konsentrasi sama dengan CMC.

4.1.1 Tegangan permukaan supernatan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1)

Identifikasi bahwa bakteri memiliki potensi sebagai penghasil biosurfaktan adalah dengan melakukan pengukuran nilai tegangan permukaan. Efektifitas dari surfaktan dapat digambarkan dengan kemampuannya dalam menurunkan tegangan permukaan (Rodrigues, *et al.* 2006). Penurunan nilai tegangan permukaan dari isolat bakteri menunjukkan diproduksinya senyawa aktif permukaan (Tabatabaee, *et al.* 2005). Berikut ini merupakan nilai tegangan permukaan dari supernatan kultur biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1).

Tabel 4.1 Nilai tegangan permukaan supernatan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1) dengan substrat molase 4% pada waktu inkubasi 3 hari

Perlakuan	Tegangan permukaan (dyne/cm)
Kontrol akuades	72 ± 0,15
Supernatan kultur <i>Acinetobacter sp.</i> P2(1) pada substrat molase	54,26 ± 3,32

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa nilai rata-rata tegangan permukaan dari supernatan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1) sebesar 54,26 ± 3,32 dyne/cm. Jika dibandingkan dengan nilai tegangan permukaan dari supernatan kontrol akuades, nilai supernatan kultur biosurfaktan mengalami penurunan tegangan permukaan sebesar 17,74 dyne/cm. Menurut Francy *et al.* (1991) mengatakan bahwa bakteri memiliki potensi menghasilkan biosurfaktan jika dapat

menurunkan nilai tegangan permukaan ≥ 10 dyne/cm. Dari hasil penurunan yang dihasilkan oleh supernatan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1) menunjukkan bahwa supernatan tersebut memiliki potensi sebagai biosurfaktan.

4.1.2 Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1)

Uji aktivitas emulsifikasi (AE) sangat penting untuk menunjukkan kualitas produksi biosurfaktan oleh bakteri *Acinetobacter sp.* P2(1). Nilai emulsifikasi biosurfaktan diukur dengan mengukur kemampuan biosurfaktan dalam mengemulsikan minyak uji yaitu solar yang memiliki tingkat dispersi yang rendah.

Emulsifikasi minyak uji solar oleh biosurfaktan tersebut terjadi karena adanya pembentukan *micelle oil* akibat adanya ikatan antara gugus hidrofobik dari tetes minyak dengan gugus hidrofil dari senyawa – senyawa asam lemak tersebut, sehingga menyebabkan terbentuk larutan emulsi antara biosurfaktan dengan minyak uji. Pembentukan *micelle* terjadi dengan mekanisme yang mengacu pada karakteristik asam lemak sebagai biosurfaktan yang memiliki sifat amfifatik (Suryatmana *et al.*, 2005).



Gambar 4.1 Aktivitas emulsifikasi biosurfaktan pada solar, (1) : emulsi

Berikut merupakan nilai dari aktivitas emulsifikasi biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) pada minyak uji solar.

Tabel 4.2 Nilai aktivitas emulsifikasi supernatan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1) terhadap minyak uji solar pada waktu inkubasi 1 jam dan 24 jam (%)

Perlakuan	Aktivitas emulsifikasi (%)	
	Solar	
	1 jam	24 jam
Molase tanpa kultur <i>Acinetobacter sp.</i> P2(1) (kontrol)	0	0
Supernatan <i>Acinetobacter sp.</i> P2(1)	21,19 ± 4,79	17,66 ± 4,39

Berdasarkan hasil nilai aktivitas emulsifikasi supernatan biosurfaktan diketahui bahwa supernatan kontrol media produksi menunjukkan nilai 0% untuk nilai persentase aktivitas emulsifikasi pada solar. Hal ini menunjukkan bahwa media kontrol tidak memiliki kemampuan untuk mengemulsi minyak uji karena tidak memiliki potensi sebagai penghasil biosurfaktan.

Jika dilihat dari supernatan media produksi dengan kultur *Acinetobacter sp.* P2(1) menunjukkan nilai persentase aktivitas emulsifikasi pada minyak uji solar. Hal ini menunjukkan bahwa supernatan tersebut memiliki kemampuan untuk dapat mengemulsi minyak uji solar dengan baik.

Minyak uji solar memiliki nilai persentase aktivitas emulsifikasi yang cenderung menurun pada waktu 24 jam inkubasi jika dibandingkan pada waktu 1 jam inkubasi. Namun, nilai penurunan persentase emulsifikasinya juga tidak terlalu jauh yaitu sekitar 3,52% penurunan aktivitas emulsifikasinya. Aktivitas emuksifikasi dilihat pada 1 jam pertama dan setelah 24 jam karena semakin lama waktu inkubasi, maka aktivitas emulsifikasinya akan semakin stabil. Waktu

inkubasi 24 jam dan setelahnya menunjukkan tingkat kestabilan dari aktivitas emulsifikasi yang dihasilkan.

4.1.3 Ekstraksi biosurfaktan dan penentuan nilai (CMC)

Supernatan hasil produksi biosurfaktan yang telah didapatkan, kemudian diekstraksi untuk mendapatkan produk kasar biosurfaktan. Ekstraksi biosurfaktan menggunakan ammonium sulfat hingga mencapai jenuh 60%. Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa kadar amonium sulfat 60% dapat efektif mengendapkan biosurfaktan. Hal ini dilihat dari supernatnya dengan nilai penurunan aktivitas emulsi paling besar, begitu juga dengan nilai tegangan permukaannya terjadi penurunan aktivitas (Fitria., 2011). Ekstraksi biosurfaktan ini dilakukan dalam keadaan dingin. *Pellet* atau endapan yang didapat setelah proses ekstraksi ini kemudian di liofilisasi dan ditimbang berat keringnya.

Perolehan rata-rata berat kering produk kasar biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Acinetobacter sp.* P2(1) pada penelitian ini adalah sebesar $6,78 \pm 2,18$ g/L. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Suciastuti (2011) mendapatkan 13,45 g/L produk kasar biosurfaktan. Perbedaan hasil yang didapatkan bisa disebabkan karena jumlah perbedaan produksi biosurfaktan pada penelitian sebelumnya dan pada penelitian saat ini.

Selain itu juga, diduga perbedaan kepekatan molase yang digunakan sebelumnya berbeda dengan kepekatan molase yang digunakan pada saat penelitian ini, Molase yang digunakan pada saat penelitian ini memiliki tingkat kepekatan yang tinggi. Nilai kepekatan molase yang terlalu tinggi juga

mempengaruhi dalam pertumbuhan bakteri pada saat proses produksi, walaupun molase disini sebagai sebagai sumber karbon bagi pertumbuhannya. Namun, pemberian sumber karbon terlalu berlebihan juga tidak baik untuk pertumbuhan bakteri. Pada pertumbuhannya, perlu diperhatikan beberapa hal seperti peran dan fungsi dari bahan yang akan digunakan, serta kadar yang dibutuhkan agar membantu pertumbuhannya bukan malah sebaliknya (Pelczar dan Chan, 2005).

Produk kasar biosurfaktan yang telah didapatkan, selanjutnya dilakukan penentuan nilai CMC dari biosurfaktan tersebut. Menurut Desai dan Banat (1997), nilai tegangan permukaan, CMC, dan stabilitas emulsifikasi merupakan ciri dan karakteristik produk biosurfaktan yang bergantung dari jenis substrat, dan bakteri. CMC dinyatakan sebagai kemampuan biosurfaktan yang larut di antara fase air dan minyak, dan sebagai tolok ukur efisiensi biosurfaktan.

Pada penelitian ini didapatkan nilai CMC produk biosurfaktan adalah sebesar 6,67 g/L. Pada penelitian sebelumnya oleh Fitria (2011) didapatkan nilai CMC untuk produksi biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) adalah sebesar 5 g/L. Semakin kecil nilai CMC, semakin sedikit kuantitas biosurfaktan (gram) dalam setiap liter air yang dibutuhkan untuk mencapai nilai tegangan permukaan terendah dan bersifat efektif sebagai senyawa aktif permukaan. Penurunan nilai tegangan permukaan yang dihasilkan saat konsentrasi mencapai stabil pada konsentrasi sama dengan CMC 6,67 g/L tersebut adalah 19,56 dyne/cm (penurunan dari kontrol akuades sebesar 72 dyne/cm dengan nilai dari larutan induk hingga stabil $52,44 \pm 1,06$ dyne/cm).

4.1.3.1 Karakteristik produk biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1)

Produk biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) yang telah diketahui nilai konsentrasinya sama dengan CMC, kemudian dikarakterisasi kembali dengan melihat nilai tegangan permukaan (dyne/cm) dan aktivitas emulsifikasinya pada minyak uji solar (%).

Produk biosurfaktan dilarutkan menggunakan buffer fosfat pH 7 dengan konsentrasi biosurfaktan pada nilai konsentrasi sama dengan CMC. Larutan produk kasar biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) pada konsentrasi sama dengan CMC memiliki nilai tegangan permukaan sebesar $53,74 \pm 0,31$ dyne/cm. Nilai penurunan tegangan permukaan dari larutan produk kasar biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) terhadap akuades sebesar $18,26 \pm 0,31$ dyne/cm dan penurunan tegangan permukaannya terhadap buffer fosfat pH 7 sebesar $17,21 \pm 1,14$ dyne/cm.

Nilai aktivitas emulsifikasinya pada minyak uji solar setelah 1 jam inkubasi dan 24 jam inkubasi sebesar $41,18 \pm 2,68$ % dan $39,26 \pm 2,24$ %. Dari nilai penurunan aktivitas emulsifikasi pada waktu inkubasi 1 jam dan 24 jam bisa dikatakan cukup stabil karena penurunan yang terjadi juga tidak terlalu jauh, hanya berkisar $1,92 \pm 2,68$ % ini artinya produk biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dengan konsentrasi sama dengan CMC memiliki aktivitas emulsifikasi yang cukup bagus pada minyak uji solar.

4.1.3.2 Karakteristik surfaktan *tween-20* dengan konsentrasi =CMC

Tween-20 merupakan jenis surfaktan sintetis yang digunakan sebagai kontrol perlakuan. Surfaktan sintetis *tween-20* sebagai surfaktan tandingan dari

biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1). Larutan *Tween-20* ditentukan pada konsentrasi sama dengan CMC. Nilai CMC dari *Tween-20* adalah 110 mg/L atau 0,11 g/L (w/v). Larutan *Tween-20* pada konsentrasi sama dengan CMC tersebut juga dikarakterisasi nilai tegangan permukaan (dyne/cm) serta nilai aktivitas emulsifikasi (%) setelah 1 jam dan 24 jam pada minyak uji solar, untuk dibandingkan dengan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1).

Nilai tegangan permukaan dari *tween-20* pada konsentrasi sama dengan CMC sebesar $56,76 \pm 0,5$ dyne/cm, dengan nilai penurunan tegangan permukaannya sebesar $15,24 \pm 0,5$ dyne/cm terhadap akuades dan sebesar $14,19 \pm 1,14$ dyne/cm terhadap pelarut buffer fosfat pH 7. Jika dibandingkan dengan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) penurunan nilai tegangan permukaan *tween-20* pada konsentrasi sama dengan CMC tidak jauh berbeda baik terhadap akuades ataupun terhadap biosurfaktan.

Nilai aktivitas emulsifikasi *tween-20* pada minyak uji solar dengan waktu inkubasi 1 jam dan 24 jam sebesar $35,5 \pm 1,031$ % dan $32,25 \pm 2,19$ %, dan nilai penurunan aktivitas emulsifikasinya sebesar $3,25 \pm 1,031$ %. Jika dibandingkan dengan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) aktivitas emulsifikasinya juga tidak berbeda jauh, baik biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan *tween-20* memiliki kemampuan emulsifikasi yang cukup baik pada minyak uji solar.

4.2 Produksi Crude Enzim Lipase *Bacillus sp.* LII63B

Tahapan selanjutnya setelah produksi biosurfaktan adalah tahapan produksi *crude* enzim *Bacillus sp.* LII63B. Sebelum tahapan produksi *crude*

enzim dilakukan, maka terlebih dahulu dilakukan pengamatan mengenai kurva pertumbuhan dan dilakukan kembali uji aktivitas enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B pada jam ke-16 untuk mengetahui nilai aktivitas lipase yang dihasilkan.

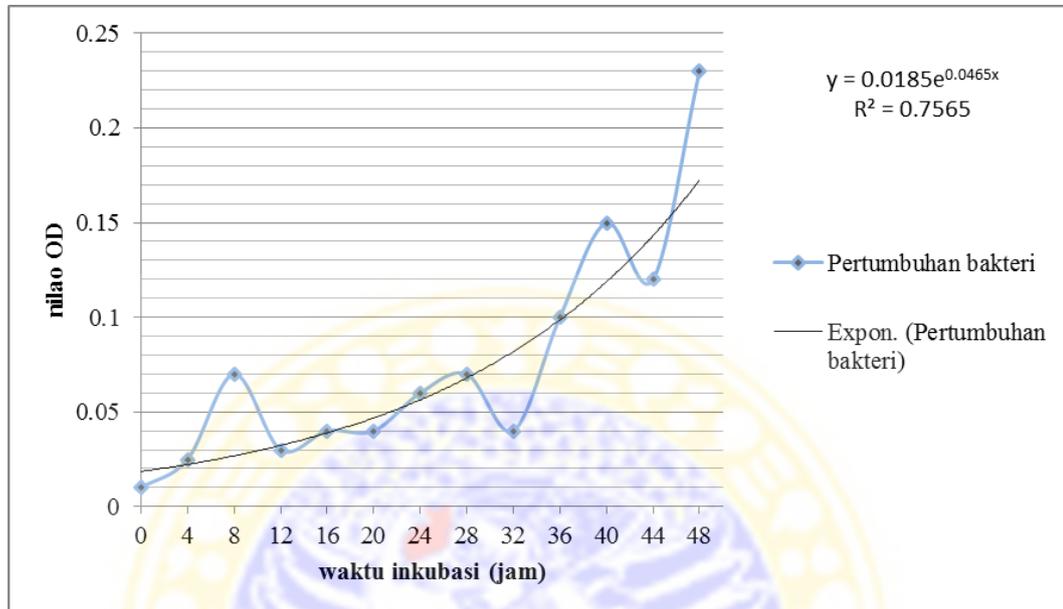
4.2.1 Kurva pertumbuhan *Bacillus sp.* LII63B

Sebelum melakukan produksi *crude* enzim dilakukan kembali pengamatan pertumbuhan kultur bakteri dalam media *Bushnell Hash* + 1% minyak dengan melihat nilai kekeruhan (OD) dari kultur di tiap jam pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer. Pengamatan dilakukan selama 48 jam dengan selang waktu pengamatan setiap 4 jam sekali. Berikut tabel nilai OD selama 48 jam pengamatan,

Tabel 4.3 Nilai *optical density* (OD) bakteri *Bacillus sp.* LII63B dalam media *Bushnell Hash* + 1% minyak pada waktu inkubasi 48 jam

Waktu inkubasi (jam ke-)	Nilai OD
0	0.01
4	0.025
8	0.07
12	0.03
16	0.04
20	0.04
24	0.06
28	0.07
32	0.04
36	0.1
40	0.15
44	0.12
48	0.23

Gambar hasil pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.* LII63B dapat dilihat pada gambar berikut ini.

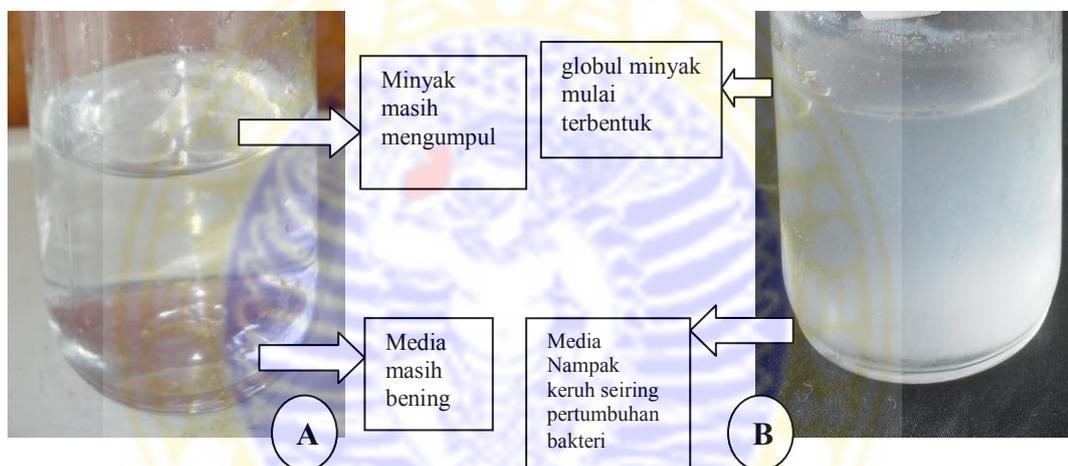


Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.* LII63B selama 48 jam dalam media pertumbuhan Bushnell hash+1% minyak goreng

Dari gambar yang ditunjukkan di atas dapat diketahui bahwa dalam waktu 48 jam, bakteri *Bacillus sp.*LII63B mengalami fasa log atau fasa eksponensial setelah mengalami fasa adaptasi selama ± 4 jam pada jam awal. Disebut sebagai fasa eskponesial karena pembelahan sel merupakan persamaan eksponensial. Pada fasa ini perbanyak jumlah sel meningkat sampai pada batas tertentu dan membutuhkan energi lebih banyak dibandingkan dengan fasa yang lain. Selain itu pada fasa ini sel menjadi cenderung lebih sensitif terhadap lingkungannya (Yuneta, 2010).

Adanya pertumbuhan dari bakteri dapat dilihat pada perubahan warna media *Bushnell Hash + 1%* minyak goreng yang semula berwarna bening, seiring dengan berjalannya waktu warna media berubah menjadi agak keruh dan semakin

keruh di titik yang terakhir yaitu pada titik jam ke-48. Selain media yang berwarna keruh, terjadi pula pembentukan globul minyak yang terjadi akibat terhidrolisisnya hidrokarbon minyak goreng oleh enzim lipase. Hidrolisis hidrokarbon minyak goreng terjadi pada ikatan ester trigliserida yang diputus oleh enzim lipase, sehingga menjadi asam lemak dan gliserol. Produk yang terbentuk selanjutnya digunakan oleh bakteri untuk kebutuhan metabolisme selnya (Renjana, 2011).



Gambar 4.3 Perbedaan media kultur bushnell hash + 1%minyak (A= Kontrol ; B= Setelah ada pertumbuhan bakteri)

Namun, jika dilihat dari gambar 4.2., ada beberapa titik jam yaitu pada titik jam ke-8, 32, 40, dan 44 memiliki nilai yang cenderung naik dan turun dari nilai pada jam sebelumnya sehingga gambaran fasa eksponensialnya tidak tergambar sesuai seperti pergerakan fasa eksponensial yang seharusnya. Hal ini bisa dikarenakan kultur yang diamati bukan berasal dari satu botol kultur yang sama, melainkan setiap titik pada tiap jamnya memiliki botol kultur sendiri. Sehingga bisa mengakibatkan perbedaan keadaan dari masing-masing botol kultur walaupun sebelumnya sudah diusahakan untuk menyamakan semua keadaannya.

4.2.2 Uji aktivitas enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B

Penentuan nilai aktivitas enzim lipase dilakukan dengan metode sebelumnya oleh Renjana (2011). Karena telah diketahui waktu maksimal untuk menghasilkan enzim lipase oleh bakteri *Bacillus sp.* LII63B adalah pada waktu ke-16 jam menurut penelitian sebelumnya (Fatimah dan Nurhariyati, 2011), maka untuk mencari nilai aktivitas enzim lipasenyanya dilakukan pada waktu optimal tersebut.

Pada waktu ke-16 jam bakteri *Bacillus sp.* LII63B memiliki nilai serapan UV-Vis dengan $\lambda = 410$ nm adalah 0,129, kemudian nilai serapan tersebut dimasukkan kedalam kurva standart *p*-nitrofenol untuk mengetahui nilai aktivitas enzimnya. Dari hasil perhitungannya, nilai aktivitas enzim dari *Bacillus sp.* LII63B adalah 11,55 U/mL.

4.2.3 Karakteristik *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B

Setelah mengetahui waktu optimal dihasilkannya enzim lipase oleh bakteri *Bacillus sp.* LII63B di waktu ke-16 jam, pemanenan produk *crude* enzim lipase juga dilakukan pada jam tersebut. *Crude* enzim yang didapatkan juga dilihat karakternya dengan mengukur tegangan permukaannya dan nilai aktivitas emulsifikasi. Pengukuran tegangan permukaan dan nilai aktivitas emulsifikasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemungkinan adanya kandungan senyawa yang bersifat aktif permukaan (surfaktan) atau *bioemulsifier* dalam *crude* enzim tersebut. Hasil perhitungan tegangan permukaan dan aktivitas emulsifikasi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B disajikan pada tabel berikut ini,

Tabel 4.4 Nilai tegangan permukaan *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B pada waktu inkubasi 16 jam (dyne/cm)

Perlakuan	TP (Dyne/cm)	Rata-rata	r TP (dyne/cm)	Standart deviasi (\pm)
Akuades	73,8	74,77	72	0.84
	75,3			
	75,2			
Media NB	62,5	65,63	63,19	2.71
	67,2			
	67,2			
Crude enzim Bacillus	50,9	51,17	49,27	0.55
	50,8			
	51,8			

Tabel 4.5 Nilai aktivitas emulsifikasi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B pada waktu inkubasi 16 jam (%) dengan minyak uji solar

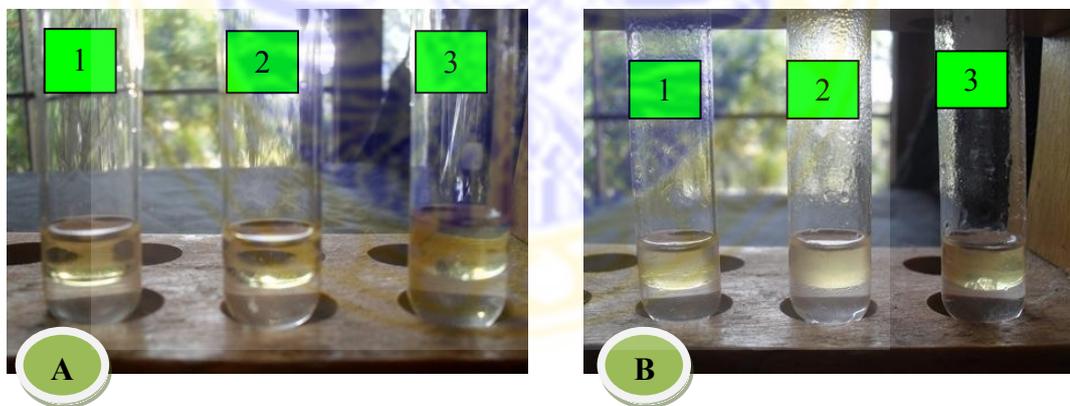
Perlakuan	Minyak uji	Waktu	AE(%)	Rata2 AE(%)	Std. Deviasi
Akuades	Solar	1 jam	0	0	0
			0		
			0		
		24 jam	0	0	0
			0		
			0		
Crude	Solar	1 jam	9.0277	10,4911	1,33
			10.8108		
			11.6348		
		24 jam	0	0	0
			0		
			0		

Berdasarkan tabel 4.4 *Crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B memiliki nilai tegangan permukaan $49,27 \pm 0.55$ dyne/cm dengan nilai tegangan permukaan kontrol NB adalah sebesar $63,19 \pm 2,71$ dyne/cm.

Aktivitas emulsifikasi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B dilakukan pada minyak uji yaitu solar. Berdasarkan tabel 4.5 hasil uji aktivitas emulsifikasi, kontrol akuades memiliki nilai persentase aktivitas 0% pada minyak uji solar. Pada minyak uji solar *crude* enzim lipase waktu inkubasi 1 jam memiliki nilai aktivitas emulsifikasi sebesar $10,49 \pm 1,33$ % dan pada waktu inkubasi 24 jam nilainya 0%.

Jadi, dari hasil ini diketahui bahwa *crude* enzim lipase tidak memiliki kemampuan untuk mengemulsi minyak uji solar karena hasil emulsi yang dihasilkan sangat rendah dan pada saat 24 jam emulsinya sudah tidak ada. Namun, *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B ini memiliki kemampuan untuk menurunkan tegangan permukaan sebesar 13,9243 dyne/cm terhadap media NB.

Aktivitas emulsifikasi dari *crude* enzim lipase pada minyak uji solar di tunjukkan pada gambar berikut,



Gambar 4.4 Aktivitas emulsifikasi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B dengan minyak uji solar

Keterangan: A = Sebelum di vortex

B = setelah divortex 24 jam

1: *Crude* enzim lipase 1

2: *Crude* enzim lipase 2

3: *Crude* enzim lipase 3

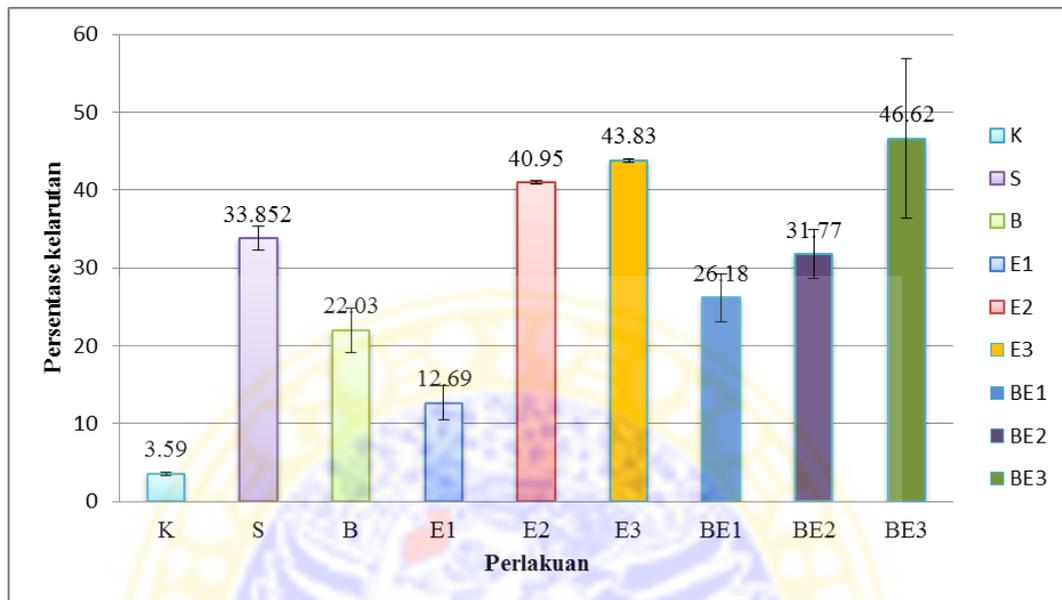
4.3 Uji Kelarutan *Oil Sludge*

Setelah tahapan produksi biosurfaktan dan *crude* enzim lipase maka tahap berikutnya adalah dilakukan uji untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh biosurfaktan dan *crude* enzim lipase terhadap kelarutan *oil sludge*. Sesuai dengan prosedur uji dan perlakuan, sebanyak $\pm 2,5\%$ (v/v) *oil sludge* ditambahkan dengan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) pada konsentrasi sama dengan CMC dan *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B. Kontrol yang digunakan dalam tahap uji ini adalah *Tween-20* sebagai pembanding dari surfaktan sintetik dengan konsentrasi sama dengan CMC (nilai = CMC : 110 mg/L) dan akuades. *Tween-20* dengan konsentrasi sama dengan CMC dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7.

Perlakuan dengan menggunakan biosurfaktan dilabel dengan kode B sedangkan perlakuan dengan *crude* enzim dilabel dengan kode E, dimana masing-masing variasi volume dibedakan dengan penambahan angka 1, 2 dan 3 setelah E untuk menunjukkan volume *crude* enzim lipase yang diberikan yaitu 1 mL (12,5% (v/v)), 2 mL (25% (v/v)), dan 3 mL (37,5% (v/v)). Kombinasi antara biosurfaktan dengan *crude* enzim lipase, pemberian kodenya mengikuti. Akuades menggunakan kode K dan kode surfaktan sintesis (*tween-20*) menggunakan kode S.

Penghitungan kelarutan *oil sludge* dengan metode sentrifugasi adalah dengan mengambil 5 mL fase cair dari masing-masing tabung perlakuan yang telah di vortex selama 15 menit kemudian di sentrifugasi (4° , 15 menit, 9000 rpm). Setelah di sentrifugasi, 1 mL supernatannya di ambil kemudian di tuangkan ke

dalam kertas saring dan di oven dengan suhu 55⁰C selama 5 jam. Berikut disajikan diagram kelarutan *oil sludge* dengan 9 perlakuan yang telah di ujikan,



Gambar 4.5 Perbandingan kelarutan *oil sludge* pada masing-masing perlakuan
Keterangan :

- K : penambahan akuades pada *oil sludge*.
- S : penambahan surfaktan sintetis (*tween-20*) pada *oil sludge*.
- B : penambahan biosurfaktan *Acinetobacter sp. P2(1)* pada *oil sludge*.
- E1 : penambahan 12,5 % (v/v) *crude enzim Bacillus sp. LII63B* pada *oil sludge*.
- E2 : penambahan 25% (v/v) *crude enzim Bacillus sp. LII63B* pada *oil sludge*.
- E3 : penambahan 37,5% (v/v) *crude enzim Bacillus sp. LII63B* pada *oil sludge*.
- BE1 : penambahan biosurfaktan dan 12,5% (v/v) *crude enzim Bacillus sp. LII63B* pada *oil sludge*.
- BE2 : penambahan biosurfaktan dan 25% (v/v) *crude enzim Bacillus sp. LII63B* pada *oil sludge*.
- BE3 : penambahan biosurfaktan dan 37,5% (v/v) *crude enzim Bacillus sp. LII63B* pada *oil sludge*.

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa tingkat kelarutan *oil sludge* secara berturut-turut dari yang paling tinggi ke yang paling rendah nilai persentasenya adalah BE3 > E3 > E2 > S > BE2 > BE1 > B > E1 > K.

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh variasi perlakuan penambahan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan variasi volume *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B di uji dengan menggunakan program *Statistical Package For Social Science 17.0* (SPSS 17). Data terlebih dahulu dianalisis dengan menggunakan metode *One sample Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui normalitas dari data. Pada uji dengan analisis *Kolmogorov-Smirnov* diketahui bahwa data kelarutan *oil sludge* ini berdistribusi normal. Data dikatakan normal apabila memiliki nilai signifikansi yang lebih dari derajat kesalahan ($> \alpha: 0.05$). Nilai signifikansi untuk uji normalitas adalah apabila nilainya $> \alpha$ maka kesimpulannya H_0 ditolak yang artinya data berdistribusi normal.

Analisis lanjutan setelah melihat normalitas data adalah melihat homogenitas varians dengan menggunakan *Levene test*. Hasil uji dengan *Levene test* ternyata nilai signifikansinya $< \alpha$ (0,024) yang artinya data tersebut memiliki varians tidak homogen. Sama dengan syarat normalitas, data dikatakan homogen apabila memiliki nilai signifikansi $> \alpha: 0.05$. Sehingga, analisis data dilanjutkan dengan uji *Brown-Forsythe* untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan penambahan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan variasi volume *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B terhadap kelarutan *oil sludge*.

Hasil uji dengan *Brown-Forsythe* memiliki nilai signifikansi $< \alpha$ (0,000) yang artinya H_0 ditolak, jadi ada pengaruh perlakuan terhadap kelarutan *oil sludge*. Selanjutnya untuk mengetahui signifikansi perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan menggunakan analisis *Independent Samples T-Test*. Uji *T-Test* menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan antara

masing-masing perlakuan penambahan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dan variasi volume *crude* enzim lipase terhadap kelarutan *oil sludge* (lampiran 9).

Berikut merupakan notasi yang dibuat dari uji *T-Test* untuk masing-masing perlakuan terhadap kelarutan *oil sludge* berdasarkan pada signifikansi antar perlakuan,

Tabel 4.6 Notasi signifikansi masing-masing perlakuan terhadap kelarutan *oil sludge*

Perlakuan	Persentase kelarutan (%)
K	3,59 ± 0,24 ^a
S	33,85 ± 1,54 ^b
B	22,03 ± 2,87 ^c
E1	12,69 ± 2,15 ^d
E2	40,95 ± 0,24 ^e
E3	43,83 ± 0,24 ^{fi}
BE1	26,18 ± 3,08 ^{cg}
BE2	31,77 ± 3,18 ^{bgh}
BE3	46,62 ± 10,24 ^{bei}

Hasil uji kelarutan pada *oil sludge* menunjukkan bahwa akuades (K) memiliki nilai kelarutan yang paling rendah sebesar 3,59 ± 0,24%. *Oil sludge* merupakan salah satu kelompok dari lipid dimana lipid merupakan senyawa organik yang terdapat di alam dan tidak dapat larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik non-polar. Akuades bersifat polar sehingga tidak dapat melarutkan *oil sludge* dengan baik karena *oil sludge* merupakan senyawa non-polar. Bahan-bahan atau senyawa kimia akan mudah larut dalam pelarut yang sama dengan zat yang terlarut (Herlina dan Ginting, 2002).

Nilai kelarutan surfaktan sintesis berupa *tween-20* (S) memiliki nilai kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan biosurfaktan *Acinetobacter*

*sp.*P2(1) sebesar $33,85 \pm 1,54\%$ dan $22,03 \pm 2,87\%$. Nilai kelarutan yang dihasilkan antara *tween*-20 (S) dan biosurfaktan (B) memiliki beda signifikan.

Tween-20 maupun biosurfaktan memiliki sifat sebagai surfaktan. Surfaktan merupakan molekul amfifatik yang terdiri dari gugus hidrofilik dan hidrofobik sehingga mampu berada di antara cairan yang memiliki sifat polar dan ikatan hidrogen yang berbeda seperti antara minyak dan air (Desai, 1997). Selain itu senyawa amfifatik yang dimiliki oleh surfaktan dapat mengurangi nilai tegangan permukaan dan interfasial dengan berakumulasi pada antarmuka dari cairan yang tidak dapat saling larut dan meningkatkan kelarutannya (Singh *et al.*, 2006). Kehadiran surfaktan akan meningkatkan konsentrasi senyawa hidrofobik (non-polar) dalam fase air (Christofi dan Ivshina, 2002). Hal inilah yang menyebabkan minyak dalam *oil sludge* dapat masuk ke dalam fase air.

Pada aplikasinya penggunaan biosurfaktan lebih menguntungkan jika dibandingkan dengan surfaktan sintetik karena biosurfaktan memiliki tingkat toksisitas yang lebih rendah dan lebih mudah terurai secara biologi (Aiyushirotabiota, 2010). Sebab, efek surfaktan sintesis untuk bioremediasi tidak dapat diprediksi, dalam kenyataannya di lingkungan surfaktan terkadang menstimulasi terjadinya bioremediasi dan terkadang malah menghambat bioremediasi itu sendiri (Singh, *et.al.*, 2006).

Variasi volume *crude* enzim lipase *Bacillus sp.*LII63B yang diberikan pada masing-masing perlakuan, ternyata memiliki nilai kelarutan yang berbeda dimana penambahan *crude* enzim lipase 1 mL (12,5% (v/v)) memiliki nilai kelarutan yang paling rendah diantara perlakuan pemberian *crude* enzim lipase 2

mL (25% (v/v)) dan 3 mL (37,5% (v/v)). Penambahan *crude* enzim lipase 3 mL (37,5% (v/v)) memiliki persentase nilai kelarutan yang lebih tinggi sebesar $43,83 \pm 0,24$ %. Jika dibandingkan, nilai signifikansi untuk *crude* enzim lipase E3 dengan *crude* enzim lipase E1 dan *crude* enzim lipase E2 memiliki beda signifikan terhadap E3. Hal ini diduga karena efektifitas enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B pada masing-masing perlakuan E1, E2, dan E3 memiliki tingkat efektifitas yang berbeda. Efektifitas masing-masing perlakuan E1, E2, dan E3 dalam memotong rantai hidrokarbon yang ada di dalam *oil sludge* sejalan dengan penambahan jumlah volume yang ditambahkan, sehingga pada perlakuan E3 memiliki nilai kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan E1 dan E2.

Perlakuan E3 dibandingkan dengan perlakuan biosurfaktan saja (B), persentase nilai kelarutan E3 lebih tinggi dengan nilai kelarutan sebesar $43,83 \pm 0,24$ % sementara nilai kelarutan B hanya sebesar $22,03 \pm 2,87\%$. Hal ini diduga karena enzim lipase dari *Bacillus sp.* LII63B mampu memotong lebih banyak rantai karbon pada minyak yang tidak dapat larut dan protein menuju fase produk yang dapat larut air (Takeyama, *et al.*, 2002).

Hasil dari kombinasi biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dengan variasi konsentrasi *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B menunjukkan bahwa perlakuan dengan penambahan biosurfaktan *Acinetobacter sp.* P2(1) dengan 37,5% (v/v) *crude* enzim lipase *Bacillus sp.* LII63B (BE3) memiliki nilai kelarutan *oil sludge* yang paling tinggi di antara semua perlakuan sebesar $46,62 \pm 10,24$ %.

Meningkatnya persentase kelarutan *oil sludge* ketika perlakuan biosurfaktan ditambahkan 3 mL (37,5% (v/v)) *crude* enzim lipase (BE3) jika dibandingkan dengan persentase kelarutannya pada perlakuan biosurfaktan saja (B), diduga karena aktivitas hidrolisis enzim lipase berjalan secara sinergis dengan aktivitas solubilisasi hidrokarbon dibandingkan oleh biosurfaktan. Sehingga, persentase nilai kelarutan BE3 yang dicapai menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan biosurfaktan saja (B).

Selain itu, bila BE3 dibandingkan dengan kelarutan pada perlakuan E3 juga tidak memiliki beda yang signifikan, hanya saja dengan penambahan 3 mL *crude* enzim lipase pada biosurfaktan semakin meningkatkan persentase nilai kelarutannya dibandingkan dengan 3 mL *crude* enzim lipase saja. Selain dari efektifitas pemotongan dengan penambahan 3 mL *crude* enzim lipase, mekanisme dari proses kelarutan sendiri tidak dapat lepas hanya dengan memotong komponen minyak, namun juga membawanya ke dalam fase air dengan bantuan dari biosurfaktan. Jadi, hal ini yang menyebabkan nilai persentase kelarutan *oil sludge* dengan BE3 lebih tinggi bila dibandingkan dengan 3 mL *crude* enzim lipase sendiri (E3) ataupun dengan biosurfaktan sendiri (B).

Bila perlakuan BE2 dibandingkan dengan E2 persentase kelarutan BE2 memiliki nilai kelarutan yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan E2 (2 mL *crude* enzim lipase) sendiri sebesar $31,77 \pm 3,18 \%$ dan $40,95 \pm 0,24 \%$. Dilihat dari sisi penambahan 25% (v/v) *crude* enzim lipase ke dalam biosurfaktan dalam melarutkan *oil sludge*, belum mampu meningkatkan aktivitas atau kemampuannya dalam menghilangkan agen pengotor yang mengandung lipid dan

derivatnya. Sebab, surfaktan mampu menghambat penetrasi lipase ke permukaan, sehingga menurunkan aktivitas lipasanya. Selain itu, ditemukan pula bahwa penurunan aktivitas lipase terjadi secara linear dengan konsentrasi surfaktan ketika trigliserid dan surfaktan diinkubasi bersama (Jurado, *et al.*, 2007). Berdasarkan hal tersebut, diduga bahwa penambahan 2 mL *crude* enzim lipase belum efektif untuk meningkatkan aktivitas lipasanya karena dihambat oleh biosurfaktan yang memiliki volume 1 mL lebih banyak. Sehingga, aktivitas enzim lipasanya dihambat untuk menembus ke permukaan *oil sludge* dan menyebabkan penurunan kelarutan *oil sludge* pada perlakuan BE2 dibandingkan dengan kelarutan pada perlakuan 2 mL *crude* enzim lipase sendiri (E2).

Jika dilihat dari sisi biosurfaktan, perolehan persentase kelarutan pada BE2 ini lebih baik dibandingkan dengan kemampuannya sendiri dalam melarutkan *oil sludge* pada perlakuan B tanpa penambahan *crude* enzim lipase. Penambahan biosurfaktan saja, hanya berperan sebagai pembawa fase minyak masuk kedalam fase air dengan meningkatkan konsentrasi senyawa hidrofobik (non-polar) dalam fase air (Christofi dan Ivshina, 2002) tanpa memotong ikatan ester yang ada pada minyak oleh enzim lipase.

Dari uji *Independent Samples T-Test* diketahui bahwa akuades (K) memiliki perbedaan yang signifikan dengan semua perlakuan yang lain dalam melarutkan *oil sludge*. Kemampuan melarutkan *oil sludge* untuk biosurfaktan sendiri (B) memiliki perbedaan yang signifikan dengan perlakuan yang lain kecuali dengan perlakuan BE1 yang tidak memiliki perbedaan signifikan. Jika ditinjau kembali, penambahan volume *crude* enzim lipase yang lebih dari 1 mL

(E2 dan E3) sudah memiliki efektifitas dalam aktivitas enzimnya untuk dapat melarutkan *oil sludge* ditunjukkan dengan nilai persentase kelarutannya yang lebih tinggi daripada perlakuan dengan biosurfaktan sendiri. Penambahan 3 mL (37,5% (v/v)) *crude* enzim lipase bila dibandingkan dengan kombinasi antara BE1 dan BE2 juga memberikan perbedaan yang signifikan dalam kelarutannya, dimana penambahan 3 mL *crude* enzim lipase sendiri memiliki nilai kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan BE1 dan BE2 sekaligus menempati posisi kedua dalam persentase kelarutannya. Tabel 4.6 menunjukkan bahwa perlakuan E3 tidak memiliki beda signifikan dengan perlakuan BE3.

Kombinasi antara biosurfaktan dan *crude* enzim lipase, berdasarkan tabel 4.6 menunjukkan bahwa perbedaan penambahan volume *crude* enzim lipase 2 mL (BE2) dan 3 mL (BE3) memberikan perbedaan yang tidak signifikan, tetapi menunjukkan nilai kelarutan yang paling tinggi ada pada perlakuan BE3 jika dibandingkan dengan BE2 dan perlakuan yang lain. Namun, perlakuan BE3 juga memiliki beda yang tidak signifikan dengan perlakuan S, E2, dan E3.

Jadi, perlakuan pada penambahan 3 mL (37,5% (v/v)) *crude* enzim lipase (E3) dapat dipilih untuk digunakan dalam melarutkan *oil sludge* karena memiliki persentase kelarutan tertinggi kedua, namun tidak memiliki beda signifikan dengan perlakuan BE3. Perlakuan yang utama dapat dipilih berdasarkan pada nilai persentase kelarutan adalah perlakuan kombinasi antara biosurfaktan 3 mL (37,5% (v/v)) dan 3 mL (37,5% (v/v)) *crude* enzim lipase (BE3), namun jika didasarkan pada signifikansi antar perlakuan, BE3 tidak memiliki beda signifikan dengan perlakuan S, E2, E3, dan BE3.