

Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Reservoir Minyak

Oleh:
Sri Kadarwati

S A R I

Teknologi *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR) bersaing secara ekonomis dan ramah lingkungan dibandingkan dengan teknologi perolehan minyak lainnya, karena MEOR tidak membutuhkan pengeluaran energi yang tinggi seperti pada pendorongan dengan uap, juga bahan kimia. Keberhasilan teknologi MEOR tergantung pada berbagai parameter antara lain mikroba dan bioproduknya. Kondisi temperatur di Indonesia memberikan efek pada aktivitas mikroba dalam reservoir. Bakteri dapat berkembang biak dengan sendirinya tanpa membutuhkan proses produksi yang mahal.

Dalam penelitian ini diperoleh 82 isolat bakteri hasil isolasi dari sampel-sampel di reservoir minyak bumi, dan 10 isolat di antaranya mampu menghasilkan biosurfaktan. Dua isolat yang terpilih yaitu P106O15 dan P106T4 diidentifikasi berdasarkan sekuen gen 16S rRNA, diketahui bahwa P106O15 adalah *Providencia rettgeri*, dan P106T4 adalah *Bacillus subtilis*. Isolat P106O15 menghasilkan biosurfaktan mulai awal pertumbuhan hingga fase kematian sel, nilai tegangan antarmuka dapat mencapai 0,00 mN/m pada jam inkubasi ke 80. Sedangkan isolat P106T4 hasilnya sama, akan tetapi nilai tegangan antarmuka terendah sebesar 0,02 mN/m.

Kata kunci: seleksi bakteri, biosurfaktan, tegangan antarmuka, reservoir minyak

ABSTRACT

MEOR can compete economically and environmental friendly with other enhanced oil recovery techniques, because MEOR does not require high energy expenditures as in steam flooding, nor expensive chemicals as in chemical flooding. The successful of MEOR technique depends on various parameters such as microbes and their bioproducts. The temperature conditions in Indonesia effect the microbes activities in reservoir. The bacteria can multiply themselves without requiring expensive production processes.

*In this study 82 isolates have been isolated from petroleum reservoirs samples and 10 of them are able to produce biosurfactant. The two selected isolates are P106O15 and P106T4 have been identified based on 16S rRNA gen sequence. The result shows that P106O15 is *Providencia rettgeri* and P106T4 is *Bacillus subtilis*. P106O15 isolate produces biosurfactant continously as long the cell's life. The lowest grade of interfacial tension can be reached down to 0.00 mN/m during 80 hours incubation. P106T4 isolate has also similar result, however the lowest grade of its interfacial tension is only 0.02 mN/m.*

Key words: selection of bacteria, biosurfactant, interfacial tension, oil reservoir

I. PENDAHULUAN

Minyak bumi yang tersimpan dalam reservoir di dalam tanah belum dapat diproduksi semua. Teknologi yang dipakai di Indonesia sekarang baru dapat memproduksi sekitar 30-40%. Dewasa ini perolehan

minyak ditekankan pada teknik produksi konvensional fase tersier yaitu *Enhanced Oil Recovery* (EOR) yang berkembang pesat sejak dunia dilanda krisis minyak pada tahun 1973 (Zhang & Zhang 1993).

Teknik produksi tersier antara lain menggunakan surfaktan yang dapat menurunkan tegangan antarmuka minyak-air yang merupakan parameter utama dalam EOR. Nilai tegangan antarmuka minyak-air yang rendah dapat diperoleh dengan menggunakan surfaktan yang berasal dari produk mikroba yang disebut *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR) yang ramah lingkungan dan lebih murah prosesnya. Oleh karena itu isolasi mikroba terus berlanjut untuk mendapatkan isolat yang dapat hidup dan tumbuh di bawah kondisi ekstrem, misalnya suhu ekstrem, salinitas ekstrem, kekuatan ion (Desai & Banat 1997).

Reservoir minyak mempunyai keragaman populasi dan aktivitas mikroorganisme, bahkan dalam kondisi reservoir yang ekstrem termofilik dan hipersalin (McInerney & Sublette 1997). Bakteri dari reservoir minyak di berbagai kedalaman masih banyak yang dapat diisolasi dan diidentifikasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri dari reservoir minyak bumi yang potensial menghasilkan biosurfaktan. Dalam reservoir minyak bumi terdapat konsorsium bakteri yang potensial sebagai penghasil biosurfaktan dan kinerja serta karakter biosurfaktan yang dihasilkannya dapat diterapkan dalam industri minyak.

Isolat-isolat bakteri yang ada di Laboratorium Bioteknologi LEMIGAS, yang diperoleh dari isolasi sampel-sampel dari reservoir minyak bumi diseleksi yang dapat menghasilkan biosurfaktan berdasarkan karakter fisiologis biokimianya. Kemudian isolat-isolat tersebut diidentifikasi menggunakan uji biokimiawi dan analisis sekuen gen 16S rRNA serta ditumbuhkan dalam media Zajic *et al.* (1977) untuk menghasilkan biosurfaktan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Mikroba

Mikroba dapat hidup di segala lingkungan termasuk di dalam reservoir minyak. Berbagai jenis mikroba, masing-masing mempunyai karakteristik tertentu. Di manapun berada, kebutuhan dasar pertumbuhan mikroba adalah sama yaitu air, sumber karbon, mineral, dan kondisi lingkungan, seperti suhu, keasaman, dan lain-lain.

Di dalam reservoir, mikroba yang dominan adalah bakteri, sumber karbon yang digunakan adalah minyak bumi dan mineral yang dibutuhkan seperti

kalsium, magnesium, besi, natrium, dan sebagainya terdapat juga di dalam reservoir. Sedang untuk air, walaupun dalam jumlah sedikit (dalam ppm) mikroba masih bisa tumbuh. Berdasarkan suhu lingkungannya, jenis mikroba dapat dikelompokkan menjadi mikroba psikrofil, mesofil, dan termofil. Mikroba psikrofil tumbuh baik pada suhu di bawah 20°C, mikroba mesofil tumbuh pada suhu antara 25 dan 40°C, sedang mikroba termofil tumbuh pada suhu 50 - 60°C, atau sampai dengan 80°C. Kisaran variasi suhu reservoir minyak di Indonesia memungkinkan mikroba untuk tumbuh dengan baik. Selain itu mikroba juga dikelompokkan dalam mikroba aerob, yaitu mikroba yang membutuhkan oksigen dalam kehidupannya, dan mikroba anaerob yang tidak atau kurang membutuhkan oksigen (terbatas).

Dalam kehidupannya, pertumbuhan dan pembiakan mikroba berinteraksi dan beradaptasi dengan lingkungannya dan dapat memberi efek positif maupun negatif. Salah satu efek positif aktivitas mikroba di lingkungan sumur minyak bumi adalah kemampuannya untuk dimanfaatkan sebagai peningkat produksi minyak terutama melalui peningkatan perolehan minyak secara mikrobiologi. Hal ini didasarkan pada kenyataan bahwa di antara mikroba itu ada yang mampu menghasilkan bioproduk seperti biosurfaktan, biosolven, bioasam, biopolimer, biofilm, dan biogas.

B. Kriteria Mikroba untuk MEOR

Selain kondisi reservoir, mikroba yang digunakan juga harus memenuhi kriteria tertentu untuk dapat diterapkan dalam MEOR. Mikroba yang dipilih harus kompatibel dengan kondisi reservoir, artinya harus dapat hidup, aktif, dan berfungsi dalam salinitas, suhu, kandungan mineral dan mikroba yang terdapat di dalam reservoir. Mengingat lingkungan reservoir adalah miskin oksigen, maka mikroba yang dapat digunakan adalah mikroba anaerob atau semi-anaerob.

Mikroba tersebut harus pula mampu melakukan aktivitas atau menghasilkan metabolit yang berguna untuk melancarkan aliran minyak ke sumur dan meningkatkan produksi minyak. Aktivitas mikroba yang dimaksud adalah sebagai berikut (McInerney, 1990), antara lain:

1. Menghasilkan bioasam, dapat dimanfaatkan untuk melarutkan partikel-partikel yang menutupi pori-pori maupun di sekitarnya, sehingga dapat

- meningkatkan porositas dan permeabilitas batuan reservoir.
2. Menghasilkan biosolven, yang dapat menurunkan viskositas minyak, meningkatkan mobilitas dan efisiensi perpindahan mikroskopik minyak.
 3. Menghasilkan biosurfaktan, yang berperan dalam menurunkan tegangan antarmuka antara minyak dan air formasi.
 4. Menghasilkan biopolimer atau biofilm, yang dapat mengendalikan mobilitas air dan dapat menutup pori-pori dalam batuan reservoir, sehingga dapat mengubah pola aliran fluida.

Di dalam tulisan/penelitian ini hanya ditekankan pada mikroba yang menghasilkan metabolit biosurfaktan, karena mayoritas reservoir di Indonesia membutuhkan biosurfaktan.

C. Peran Biosurfaktan dalam EOR

Minyak yang terperangkap sebagai ganglia dikelilingi oleh batuan dan diisolasi oleh air dalam kapiler dapat meningkatkan tegangan antarmuka minyak-air. Nilai tegangan antarmuka minyak air dan kecepatan fluida menyebabkan minyak terjerebab (Moses & Springham 1982).

Biosurfaktan merupakan zat aktif permukaan yang disintesis oleh mikroba dan berpotensi besar pada industri minyak antara lain dalam bidang MEOR. Pada tahun 1970an biosurfaktan mulai digunakan untuk meningkatkan perolehan minyak. Biosurfaktan membantu MEOR dalam menurunkan tegangan antarmuka antara permukaan batuan-minyak dan minyak-air di mana substansi yang tidak larut (*insoluble*) berubah menjadi fase tunggal dalam medium.

Selain itu biosurfaktan juga mempunyai kemampuan untuk menurunkan kekuatan kapilaritas sehingga dapat mencegah pergerakan minyak masuk ke pori batuan dan memudahkan interaksi senyawa hidrofobik dengan lingkungan *aqueous* untuk pengaliran intraselular yang cepat serta membentuk emulsifikasi, sehingga membantu melepaskan lapisan tipis minyak dari batuan. Biosurfaktan dapat bereaksi dengan campuran bahan organik yang terserap pada batuan dan mengubah kebasahan batuan sehingga dapat mengubah permeabilitas relatif dan aliran fraksi.

Studi mekanika menyimpulkan bahwa biosurfaktan adalah zat yang terbaik dalam pemindahan parafin dengan perkiraan biaya 30% lebih rendah daripada

surfaktan sintetis. Biosurfaktan secara nyata menurunkan tegangan antarmuka minyak dan larutan garam sampai 0,01 mN/m, sehingga biosurfaktan sangat potensial untuk proses EOR (McInerney 1990).

III. METODOLOGI

Isolat diseleksi berdasarkan kemampuannya menghasilkan biosurfaktan dengan cara ditumbuhkan *olive oil*, medium agar darah, dan pembentukan emulsi dalam medium garam mineral (Basal Salt Medium, BSM), baik dengan ataupun tanpa penambahan hidrokarbon selama waktu inkubasi. Kemudian dipilih dua isolat (P106O15 dan P106T4) untuk memproduksi biosurfaktan dan diidentifikasi dengan serangkaian uji biokimiawi dan analisis sekuen gen 16S rRNA. Produksi biosurfaktan dilakukan dalam medium formula dari Zajic *et al.* (1977). Kode isolat disusun berdasarkan kombinasi asal lapangan minyak, nomor sumur minyak, medium isolasi, dan nomor urut cawan Petri.

A. Seleksi Isolat Penghasil Biosurfaktan

Metode yang digunakan untuk seleksi isolat yang menghasilkan biosurfaktan ada tiga macam yaitu: 1) metode menurut Morikawa *et al.* (1992) dalam Richana (1997) pada medium agar *olive oil*, dengan medium dasar TSA ditambah minyak zaitun (*olive oil*), 2) metode penapisan dilakukan pada medium agar darah (Balows *et al.* 1992) dengan medium dasar TSA yang ditambah darah domba yang telah diperlakukan defribinasi dalam tiap liter medium dasar, 3) metode penapisan yang merupakan pengujian pembentukan emulsi (Banerjee *et al.* 1983). Isolat ditumbuhkan baik dalam BSM yang ditambah glukosa dan minyak mentah, ataupun dalam BSM tanpa minyak mentah. Pengamatan dilakukan dengan melihat stabilitas pembentukan zona emulsi setiap jam. *Bacillus pumilus* JCM 2508 digunakan sebagai kontrol positif dalam tiap pengujian.

C. Kurva Pertumbuhan

Dua isolat terpilih yang menghasilkan biosurfaktan diuji kurva pertumbuhannya. Pengujian dengan fermentasi biosurfaktan menggunakan medium dengan formula dari Zajic *et al.* (1977). Pengujian dilakukan dengan masa inkubasi: 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, dan 120 jam dalam *shaker water bath* sentripetal pada suhu 50°C dan

kecepatan pengocokan 80 rpm, dengan perlakuan dua kali ulangan. Penghitungan populasi dilakukan dengan metode *total plate count*.

C. Tegangan Antarmuka

Tegangan antarmuka diukur menggunakan medium fermentasi dengan minyak mentah dengan alat *Processor Tensiometer* tipe K.12/MK.4 nomor seri 94303 merk Kruss dengan ketelitian 0,01 mN/m. Pencatatan data dilakukan sampai didapat data stabil. Pengukuran tegangan antarmuka dilakukan dengan dua kali ulangan.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

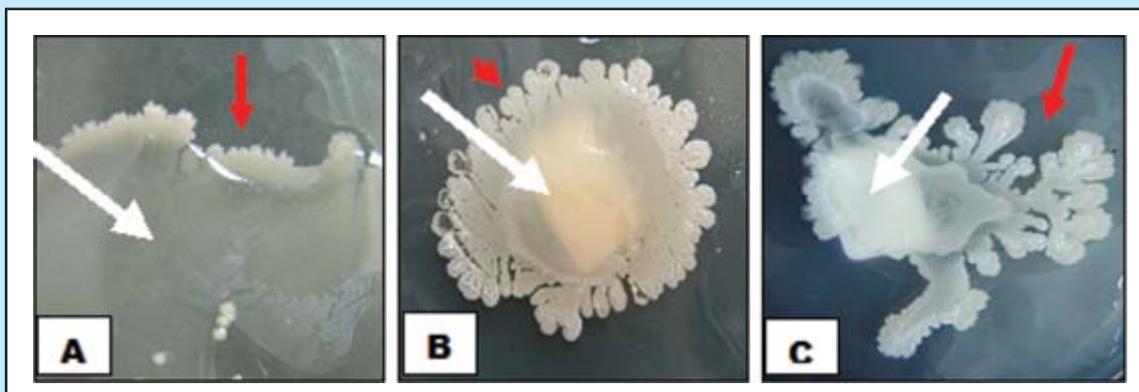
A. Hasil Seleksi Isolat yang Menghasilkan Biosurfaktan

Dari hasil isolasi mikroba di reservoir minyak, dapat diperoleh 82 isolat. Isolat-isolat ini diseleksi dalam medium agar *olive oil*. Bakteri yang menghasilkan biosurfaktan akan menampilkan adanya halo emulsi di sekeliling koloni dan lapisan transparan di permukaan koloni isolat (Gambar 1). Pengamatan menggunakan metode ini menghasilkan 42 isolat yang membentuk halo emulsi. Emulsi yang terbentuk merupakan biosurfaktan yang membentuk emulsi dengan *olive oil*, dari gugus hidrofobik biosurfaktan berikatan dengan gugus hidrofobik *olive oil*. Namun dalam pengamatan ini sulit dibedakan antara isolat bakteri yang membentuk halo emulsi dan isolat yang mampu menggunakan *olive*

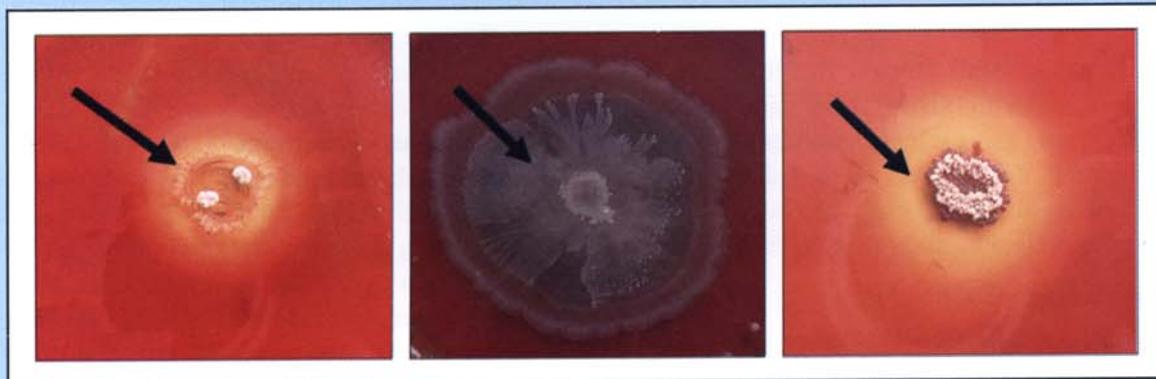
oil sebagai sumber karbon, juga terdapat perubahan warna koloni menjadi hijau seperti pada isolat P106O28, P106O30, P106O31, P336P4, P336P5, P336P7, dan P336P8. Untuk itu dilakukan seleksi lebih lanjut dengan metode hidrolisis agar darah dengan terbentuknya zona hidrolisis di sekeliling koloni.

Metode hidrolisis agar darah, dilakukan dengan mengacu pada surfaktin (biosurfaktan yang dihasilkan *Bacillus subtilis*) yang potensial dari kelompok antibiotik lipopeptida. Biosurfaktan ini menyebabkan lisis sel-sel eritrosit dan sebagai penghambat pembekuan darah (Anonim d 2004). Namun bakteri yang mampu menghidrolisis darah tidak berarti penghasil biosurfaktan karena kemampuan menghidrolisis darah bisa juga oleh protease, toksin sitolitik, dan eksotoksin, seperti pada *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* pada kelompok bakteri Gram positif (Madigan *et al.* 2000).

Hasil pengamatan isolat, yang menunjukkan terbentuknya zona hidrolisis pada medium agar darah (Gambar 2) terdapat 38 isolat. Dari isolat-isolat ini terdapat isolat yang tidak membentuk halo emulsi pada medium *olive oil*, tetapi mampu menghidrolisis darah. Isolat mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menghidrolisis darah, baik dalam kecepatan maupun kemampuan membentuk zona bening. Ada beberapa isolat yang membutuhkan waktu yang lama, lebih dari 4 hari inkubasi baru membentuk zona bening dan diameter zona relatif kecil, kurang dari 1 cm, seperti pada isolat P106O1, P106O2, P106O6,



Gambar 1
Pembentukan halo emulsi pada medium *olive oil*
A. P106T4; B. P106O15; C. Kontrol (BP JCM 2508);
Tanda anak panah (→) : Koloni isolat dan (⇨) : Lapisan emulsi

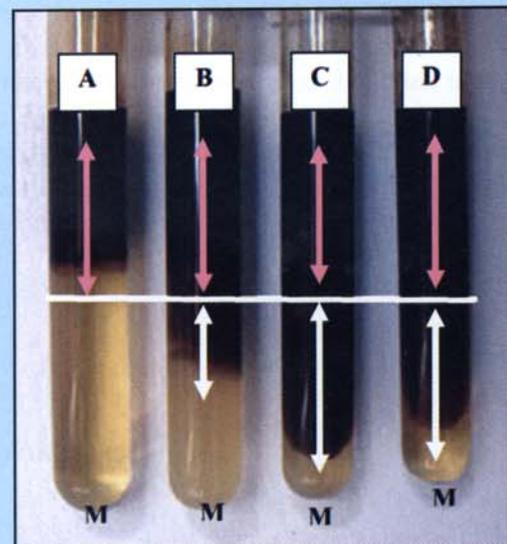


Gambar 2
Pembentukan zona hidrolisis pada medium agar darah A. P106T4 B. P106O15.
C. Kontrol (BP JCM 2508) Tanda anak panah (→) : Zona hidrolisis

P106O7, P106O18, P106O20, P106O21, P106O22, P106P1, P106P3, P106P4, P106P5, P336O7, P336O8, P336P4, P336P5, P336P6, P336P7, walaupun isolat-isolat tersebut mampu membentuk zona emulsi. Dari metode ini terdapat pembentukan diameter zona bening yang terbesar pada isolat P106T3 dan P106T4 kurang lebih 4 cm. Tetapi besar kecilnya diameter zona bening yang terbentuk tidak bisa dijadikan acuan sebagai penghasil biosurfaktan yang besar (Richana 1997).

Metode yang terakhir yaitu dengan pembentukan emulsi secara kuantitatif baik inkubasi dengan penambahan minyak mentah maupun tidak. Metode ini untuk mengetahui pembentukan biosurfaktan yang perlu diinduksi substrat hidrokarbon atau tidak. Zona emulsi yang terbentuk diamati kestabilannya hingga 24 jam (Gambar 3) dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu medium + minyak mentah.

Isolat yang mampu membentuk emulsi tanpa minyak mentah selama inkubasi adalah P106O4, P106O5, P106O8, P106O9, P106O11, P106O13, P106O15, P106O20, P106O32, P106T3 dan P106T4. Sembilan isolat yang mampu membentuk emulsi dengan penambahan minyak mentah selama masa inkubasi yaitu: P106O9, P106O15, P106O16, P106O33, P106T3, P106T4, P336O5, P336O6, dan P336O8. Dari 9 isolat ini ada yang tidak mampu membentuk zona emulsi jika tanpa minyak mentah yaitu: P106O16, P106O33, P336O5, P336O6, dan P336O8. Sebaliknya isolat P106O4, P106O5, P106O8, P106O11, P106O13, P106O20, P106O32



Gambar 3
Pembentukan zona emulsi medium dengan minyak mentah. A : Kontrol negatif (Medium + minyak mentah); B : P106T4; C : P106O15; D : Kontrol positif (BP JCM 2508).
Tanda ↔ : Zona minyak mentah;
↔ : Zona emulsi; M : Medium

tidak membentuk zona emulsi jika ada minyak mentah. Pembentukan emulsi yang tidak terpengaruh ada tidaknya minyak mentah terdapat pada isolat P106O9, P106O15, P106T3, dan P106T4. Semua isolat yang mampu membentuk emulsi dengan minyak mentah merupakan isolat yang mampu menghidrolisis

darah, kecuali isolat P336O5, P106O6, dan hampir semuanya membentuk zona emulsi pada medium *olive oil*, kecuali P106O5.

Berdasarkan hasil seleksi biosurfaktan dan karakternya, maka dipilih dua isolat yaitu P106O15 dan P106T4 yang mampu membentuk emulsi dengan minyak mentah dengan atau tanpa induksi minyak mentah, menghidrolisis darah, membentuk emulsi dengan *olive oil* dan karakter fisiologi biokimia.

B. Identifikasi Isolat Terpilih

Identifikasi ke dua isolat terpilih dilakukan dengan cara mengisolasi DNA, yang digunakan sebagai DNA cetakan sebesar 300 ng dan amplifikasi gen 16S rRNA sebesar 1500 bp, diukur berdasarkan penanda (marker) *Lambda Pst1*, hasilnya disajikan dalam Gambar 4.

Hasil uji biokimiawi dan fisiologi untuk identifikasi, isolat P106O15 adalah bakteri Gram negatif, aerob, mempunyai morfologi koloni berwarna putih, elevasi datar, tepian bercabang, bentuk bundar dengan tepi menyebar dan tidak konsisten. Berdasarkan analisis penjajaran sekuen parsial 1296 nukleotida gen 16S rRNA menggunakan program Blast mempunyai kesamaan dengan *Providencia rettgeri*. Sedang isolat P106T4 adalah bakteri Gram negatif, anaerob fakultatif, mempunyai morfologi koloni berwarna kuning muda, elevasi cembung, tepian licin, bentuk bundar dan tidak konsisten. Berdasarkan analisis penjajaran sekuen parsial 1292 nukleotida gen 16S rRNA menggunakan program Blast mempunyai kesamaan dengan *Bacillus subtilis*.

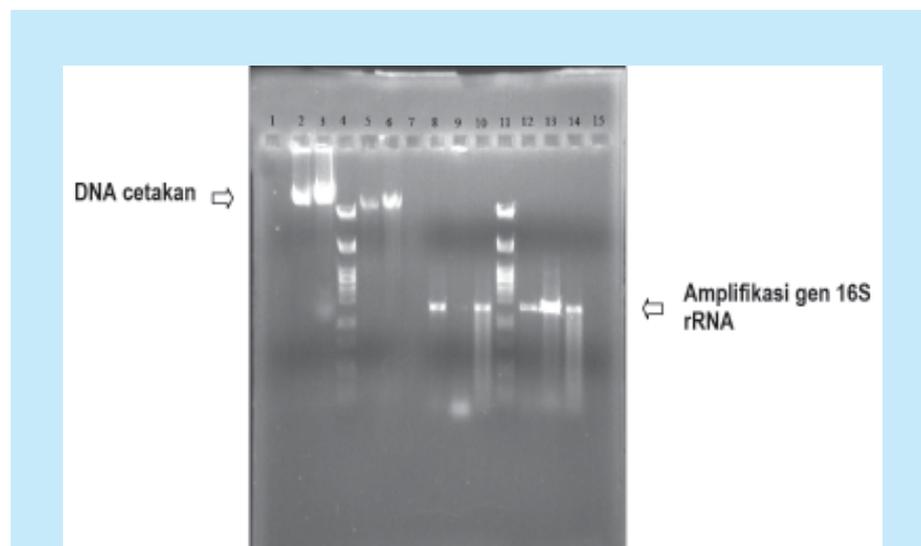
Kedua isolat mampu menggunakan berbagai sumber karbon yaitu jenis monosakarida, antara lain: arabinosa, fruktosa, dan glukosa; disakarida, antara lain: sukrosa, maltosa; gula alkohol, yaitu inositol dan manitol; karbohidrat kompleks, yaitu dekstrin dan pati; dan makro molekul selulosa. Selain itu, isolat P106O15 juga

mampu menggunakan galaktosa, sedangkan isolat P106T4 mampu menggunakan rafinosa dan sorbitol.

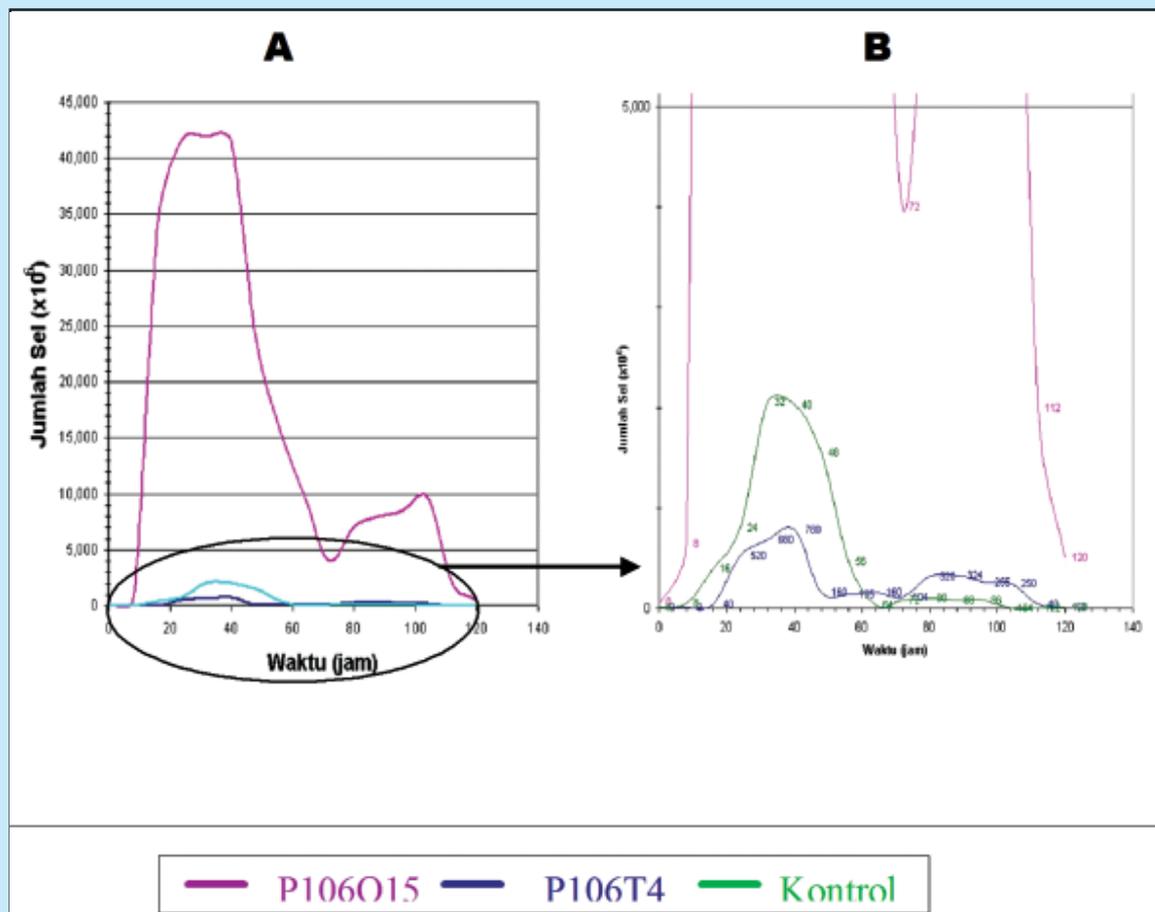
Kemampuan menggunakan sumber karbon yang beragam sangat menguntungkan dalam mencari alternatif sumber karbon yang murah dan mudah didapat untuk penerapannya. Sumber karbon yang relatif murah dan mudah didapat yaitu sukrosa dan pati. Sumber karbon bagi bakteri mempunyai dua fungsi yaitu untuk sintesis karbohidrat, lipida, asam amino, basa purin, dan pirimidin penyusun sel dan sumber energi berupa ATP. Energi ini diperoleh melalui transformasi metabolik asimilasi karbohidrat ke dalam sel.

C. Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan merupakan replikasi dari populasi sel. Waktu yang diperlukan untuk siklus pertumbuhan bakteri sangat beragam dan tergantung pada sejumlah faktor antara lain nutrisi dan genetika (Madigan 2000). Pertumbuhan mikroba didefinisikan sebagai pertambahan dan jumlah sel karena terjadi pembelahan sel. Mikroba mempunyai empat fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase logaritmik, fase stasioner, dan fase kematian. Fase-fase ini merupakan bentuk standar kurva pertumbuhan bakteri (Madigan 2000).



Gambar 4
Hasil elektroforesis DNA cetakan dan amplifikasi gen 16S rRNA.
Keterangan : 1 = Kontrol negatif; 2&3 = DNA isolat P106O15;
4 = Marker *Lambda Pst1*; 5&6 = DNA isolat P106T4;
7 = —; 8,9,&10 = DNA amplifikasi gen 16S RNA isolat P106T4;
11 = Marker *Lambda Pst1*; 12,13,&14 = DNA amplifikasi gen 16S RNA isolat P106O15.



Gambar 5 A
Grafik pertumbuhan isolat P106O15,
P106T4 dan kontrol fungsi
dari lama inkubasi

Gambar 5 B
Grafik pertumbuhan isolat P106T4 dan
kontrol fungsi dari lama inkubasi
(diperbesar dari grafik 5 A)

Pada grafik kurva pertumbuhan yang digambarkan dalam jumlah populasi sel, kedua isolat mengikuti grafik kurva pertumbuhan pada umumnya tetapi populasi sel jauh berbeda, populasi optimum isolat P106O15 mencapai 10^8 sel/mL, sedang isolat P106T4 mencapai 10^6 sel/mL (Gambar 5A). Untuk mendapatkan grafik pertumbuhan yang lebih detail, diperlukan waktu pengamatan yang lebih kecil lagi. Pada kurva ini waktu pengamatan dilakukan tiap 8 jam sekali.

Isolat P106O15 (Gambar 5 A) memerlukan waktu adaptasi kurang lebih 8 jam yang merupakan fase lag untuk menghasilkan biosurfaktan. Setelah fase ini kemudian diikuti fase logaritmik yang ditandai dengan lonjakan populasi hingga jam ke-20 dengan laju

pertumbuhan spesifik maksimum $0,12/\text{jam}$ dan waktu generasi $2,67$ jam. Akhir fase ini dilanjutkan dengan fase stasioner yaitu tidak terjadi pertambahan jumlah populasi sel yang terjadi dari jam ke-20 hingga jam ke-40. Setelah jam ke-40 jumlah populasi sel menurun tajam hingga jam ke-70, fase ini merupakan fase kematian, tetapi sel masih mampu melakukan pertumbuhan walaupun dalam jumlah relatif sedikit hingga jam ke-110, yang ditunjukkan dengan kenaikan kurva. Kemampuan isolat P106O15 tumbuh meningkat lagi di akhir fase kematian ini kemungkinan isolat menggunakan sumber karbon minyak mentah setelah glukosa habis.

Isolat P106T4 (Gambar 5B) memerlukan waktu adaptasi kurang lebih 16 jam, fase ini merupakan fase

lag, kemudian diikuti fase logaritmik hingga jam ke-35 dengan laju pertumbuhan spesifik maksimum 0,12/jam dan waktu generasi 2,18 jam. Fase stasioner tidak teramati pada pengamatan tiap 8 jam, sehingga kemungkinan fase ini terjadi relatif cepat kurang dari 8 jam. Pada jam ke-40 pertumbuhan populasi sel menurun tajam, fase ini merupakan fase kematian dan mencapai jumlah populasi sel terendah pada jam ke-50. Setelah jam ke-70 sel mengalami pertumbuhan hingga jam ke-110, seperti pada isolat P106O15.

Medium kultur inkubasi untuk memproduksi biosurfaktan menggunakan dua sumber karbon yaitu glukosa dan minyak mentah. Bakteri akan menggunakan glukosa lebih dahulu daripada sumber karbon lain untuk pertumbuhannya. Bakteri tumbuh eksponensial menggunakan glukosa hingga fase lag dan akhirnya tumbuh secara eksponensial dengan sumber karbon kedua yaitu minyak mentah.

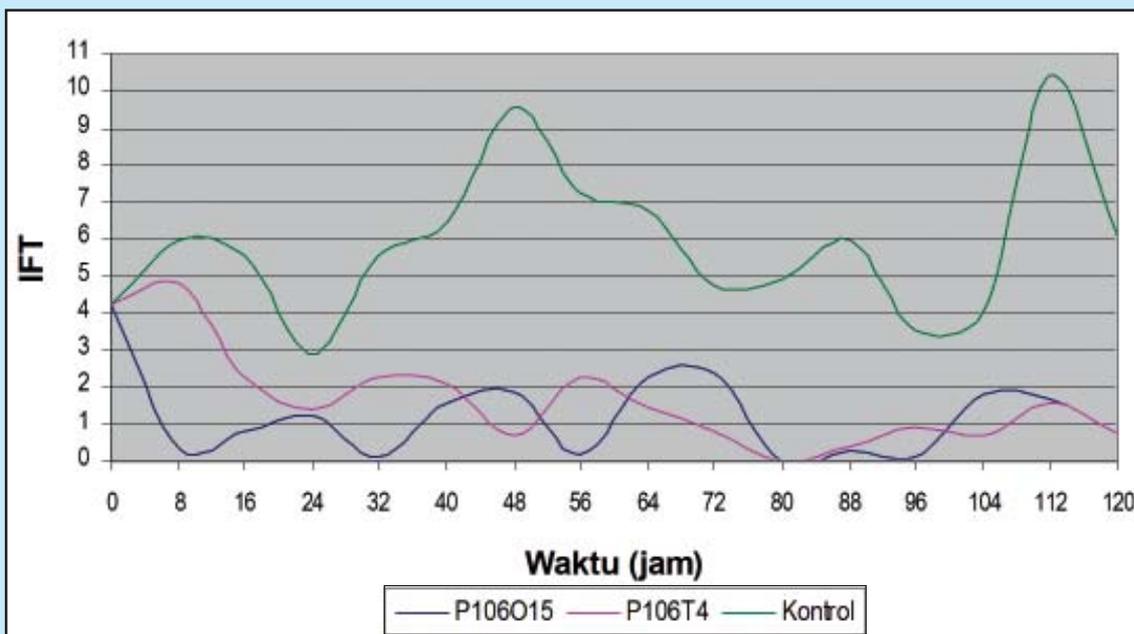
Pada kontrol (Gambar 5B) sel memerlukan waktu adaptasi kurang lebih 8 jam seperti pada isolat P106O15, yang kemudian diikuti fase logaritmik hingga jam ke-35 dengan laju pertumbuhan spesifik maksimum 0,08/jam dan waktu generasi 8,05 jam. Fase stasioner tidak teramati pada pengamatan tiap 8 jam dan pada fase ke-40 jumlah sel menurun tajam

yang merupakan tanda fase kematian. Jumlah sel terendah terdapat pada jam ke-64. Setelah fase kematian sel tidak melakukan pertumbuhan lagi seperti pada isolat P106O15 dan P106T4, hal ini ditandai dari garis kurva yang mendatar. Hasil ini menggambarkan kontrol tidak dapat menggunakan minyak mentah sebagai sumber karbon dan pertumbuhan terhenti pada jam ke-80.

Kedua isolat memerlukan waktu adaptasi yang berbeda, isolat P106T4 memerlukan waktu 8 jam lebih lama dari isolat P106O15 yang ditunjukkan pada fase lag. Fenomena ini terjadi juga pada fase log. Tetapi fase kematian keduanya terjadi pada waktu yang bersamaan yaitu pada 56 jam. Perbedaan yang nyata dengan kontrol terjadi pada fase kematian, kedua isolat masih mampu bertahan hidup sampai kisaran 112 jam tetapi kontrol pada jam ke-80.

D. Tegangan Antarmuka

Kedua isolat mampu menurunkan tegangan antarmuka mulai pada fase lag pertumbuhan (Gambar 6). Isolat P106O15 pada inkubasi 8 jam mulai mampu menurunkan tegangan antarmuka medium dengan minyak mentah. Nilai tegangan antarmuka terendah yaitu 0,00 mN/m dicapai pada inkubasi 80 jam dari nilai semula 4,21 mN/m pada jam ke-0.



Gambar 6
Grafik tegangan antarmuka isolat penghasil biosurfaktan fungsi dari lama inkubasi

Isolat P106T4 mampu menurunkan tegangan antarmuka pada inkubasi 16 jam dan nilai terendah dicapai pada inkubasi 80 jam sebesar 0,02 mN/m dari nilai semula 4,21 mN/m. Nilai tegangan antarmuka minyak mentah dan medium pada kultur kedua isolat setelah fase lag pertumbuhan menunjukkan kecenderungan menurun pada kisaran nilai 0,00 - 2,35 mN/m dari nilai semula 4,21 mN/m hingga fase kematian sel.

V. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Didapat 82 isolat bakteri dari reservoir minyak bumi, 10 di antaranya mampu menghasilkan biosurfaktan dan dipilih dua isolat yaitu P106O15 dan P106T4 untuk pengujian selanjutnya.
2. Isolat P106O15 adalah *Providencia rettgeri* dan isolat P106T4 adalah *Bacillus subtilis*.
3. Isolat P106O15 memerlukan fase lag selama 8 jam, fase logaritmik sampai 20 jam, laju pertumbuhan spesifik maksimum 0,12/jam dan waktu generasi 2,67 jam. Isolat P106T4 memerlukan fase lag selama 16 jam, fase logaritmik sampai 35 jam, laju pertumbuhan spesifik maksimum 0,12/jam dan waktu generasi 2,18 jam.
4. Isolat P106O15 dan isolat P106T4 memproduksi biosurfaktan mulai fase lag sampai fase kematian sel, tetapi pada akhir fase kematian terjadi peningkatan produksi.
5. Biosurfaktan yang dihasilkan isolat P106O15 mampu menurunkan nilai tegangan antarmuka terendah sampai 0,00 mN/m pada inkubasi 80 jam, sedangkan isolat P106T4 0,02 mN/m pada inkubasi 80 jam dari nilai semula 4,21 mN/m.

KEPUSTAKAAN

1. Balows AH, Truper G, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. 1992. The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Edisi ke 2. New York: Springer-Verlag
2. Banerjee S, Duttagupta S, Chakrabarty AM. 1983. Production of Emulsifying Agent During

Growth of *Pseudomonas cepacia* with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. Arch Microbiol 135:110-114.

2. Desai JD, Banat IM. 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential [Review]. Microbiol. Mol. Biol. 61:47-64
3. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. et al. 2000. Brock Biology of Microorganism. Edisi ke 9. New Jersey: Prentice Hall.
4. McInerney MJ. 1990. Current Assessment of Microbial Processes to Enhanced the Recovery of Oil. Oklahoma: Departement of Botany and Microbiology University of Oklahoma.
5. McInerney MJ, Sublette KL. 1997. Petroleum Microbiology: Biofiling, Souring, and Improved Oil Recovery. Di dalam: Hurst CJ, Knudsen GR, Mc Inerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV, editor. Manual of Environmental Microbiology. Washington: ASM Press.
6. Moses V, Springham DG. 1982. Bacteria and the Enhancement of Oil Recovery. London: Applied Science Publishers. Enhanced Oil Recovery: A Potential Role for Microorganisms; hlm 1, 8-10.
7. Richana N. 1997. Isolasi, Seleksi dan Identifikasi Bakteri Lokal Penghasil Biosurfaktan (Lipopeptida). [Thesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor, Program Pascasarjana.
8. Zajic, JE, Guignard H, Gerson DF. 1977(b). Emulsifying and Surface Active Agents from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. Biotech. Bioeng. 19:1285-1301.
9. Zhang CY, Zhang JC. 1993. A Pilot Test of EOR by *In-situ* Microorganism Fermentation in The Daqing Oil Field. Di dalam: Premuzic E, Woohead A, editor. Microbial Enhancement of Oil Recovery Recent Advances. Proceedings of the 1992 International Conferences on Microbial Enhanced Oil Recovery. Amsterdam: Elsevier.
10. Zessi Menursita. 2005. Isolasi, Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Reservoir Minyak Bumi dan Karakterisasi Biosurfaktan yang Dihasilkannya untuk *Enhanced Oil Recovery*. Tesis. Sekolah Pascasarjana. IPB Bogor.