

Karakterisasi Biosurfaktan yang Dihasilkan Bakteri *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* dari Reservoir Minyak di Indonesia

Oleh:

Sri Kadarwati

S A R I

Biosurfaktan merupakan suatu surfaktan yang disintesis oleh organisme. Zat ini mempunyai kemampuan antara lain menurunkan tegangan antarmuka antara minyak-air, yang berpotensi untuk meningkatkan perolehan minyak. Penelitian ini mempelajari karakteristik biosurfaktan yang mencakup kinetika pembentukan, jenis, dan komposisi senyawa penyusun biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* dari reservoir minyak di Indonesia.

Peningkatan produksi biosurfaktan baik dari *Providencia rettgeri* maupun *Bacillus subtilis* sesuai dengan kurva pertumbuhannya, ditandai dengan semakin banyaknya jumlah populasi sel semakin meningkat juga produksi biosurfaktannya. Pada percobaan ini, sebagai sumber karbon digunakan glukosa dan minyak mentah (hidrokarbon). Pada awal pertumbuhan, glukosa dimanfaatkan terlebih dahulu, sehingga kandungan glukosa akan menurun dan habis pada jam ke-60. Produksi biosurfaktan meningkat kembali, karena kedua bakteri menggunakan sumber karbon lain yaitu hidrokarbon yang ada di dalam media.

Biosurfaktan yang dihasilkan kedua jenis bakteri tersebut mempunyai struktur yang sama dengan surfaktin, dengan kandungan masing-masing sebesar 22,09 ppm dan 27,54 ppm. Selain itu didapat 17 macam kandungan asam amino, sesuai dengan yang terkandung di dalam surfaktin, sebagai kontrol, kecuali prolin dan sistin.

Kata kunci : biosurfaktan, karakteristik, *P. rettgeri*, *B. subtilis*, surfaktin, asam amino

ABSTRACT

Biosurfactant is a surface active agent which synthesized by organisms. This agent has capability to decrease interfacial tension between hydrocarbon and water, which potential to enhance oil recovery. This research is studying on, biosurfactant characteristics including the kinetics, types, and composition of biosurfactant compound that produced by Providencia rettgeri and Bacillus subtilis from Indonesian reservoirs.

The increasing of biosurfactant production both by Providencia rettgeri and Bacillus subtilis relates to growth curve, identified by the more cell population shows the increasing biosurfactant production. In this experiment, glucose and hydrocarbon were used as a carbon source. In the beginning of activity, firstly glucose as a carbon source was used, so that the glucose completed utilized at 60th hours. Biosurfactant production was able to reincrease, because of both bacteria used hydrocarbon which present in the media.

Biosurfactant produced by Providencia rettgeri and Bacillus subtilis have the same structure with surfactine, each around 22.09 ppm and 27.54 ppm. Besides 17 types of amino acids that identic to amino acids from surfactine, as a control, were obtained, except proline and sistine.

Key words : biosurfactant, characteristic, P.rettgeri, B.subtilis, surfactine, amino acids

I. PENDAHULUAN

Konsumsi surfaktan sintetis (kimia) di bidang petrokimia sangat besar. Beberapa surfaktan sintetis bersifat toksik, tidak dapat didegradasi dan tidak mempunyai toleransi yang tinggi terhadap salinitas air karena konsentrasi Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan temperatur tinggi (Zajic *et al.* 1977). Dibandingkan dengan surfaktan kimia, biosurfaktan sangat selektif, cukup diperlukan dalam jumlah kecil, efektif di bawah kisaran luas kondisi minyak dan reservoir. Dari sudut pandang ekologi, biosurfaktan banyak menguntungkan karena nontoksik dan ramah lingkungan (Desai & Banat 1997).

Biosurfaktan berbeda-beda sintesisnya dalam lingkungan yang moderat. Biosurfaktan dan mikroba yang menghasilkannya, dapat diterapkan di berbagai sektor industri, kesehatan, dan lingkungan. Sektor-sektor ini menunjukkan kondisi suhu ekstrim, kekuatan ion, keasaman, salinitas ekstrim, dan pelarut organik (Desai & Banat 1997). Daya tarik tentang biosurfaktan sangat tinggi karena biosurfaktan dapat diproduksi dalam berbagai jenis dengan sifat yang berbeda-beda (Duvnjak *et al.* 1982).

Penelitian ini bertujuan mempelajari karakter biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* meliputi: pertumbuhan dan kinetika pembentukan, analisis jenis biosurfaktan, dan komposisi senyawa penyusunnya. *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* adalah isolat-isolat bakteri koleksi Laboratorium Bioteknologi LEMIGAS, yang diisolasi dari reservoir minyak bumi. Standar yang digunakan adalah surfaktin dari Sigma yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*.

II. BIOSURFAKTAN

Biosurfaktan adalah surfaktan yang disekresi oleh sel-sel mikroba yang ditumbuhkan pada hidrokarbon tertentu, juga memungkinkan dihasilkan dari substrat lain seperti karbohidrat (Cooper & Zajic 1980). Keutamaan kultur mikroba adalah kemampuannya mengekskresi relatif besar atau substansi aktif permukaan yang mengemulsi atau membasahi fase hidrokarbon (Margaritis *et al.* 1979).

Daya tarik tentang biosurfaktan meningkat akhir-akhir ini, karena sangat potensial menurunkan tegangan antarmuka pada konsentrasi rendah dan homogen (Cooper & Zajic 1980). Biosurfaktan ini sangat bervariasi, sehingga sangat luas fungsinya,

ramah lingkungan, disintesis oleh beragam mikroba, kemungkinan memproduksinya melalui fermentasi, dan potensi penerapannya dalam perlindungan lingkungan, perolehan minyak, kesehatan, dan proses industri makanan.

Struktur analisis biosurfaktan membuka kemungkinan untuk sintesis kimianya. Hal yang terpenting adalah diterima lingkungan karena terdegradasi dengan cepat dan mempunyai toksisitas yang rendah daripada surfaktan sintetis (Margaritis *et al.* 1979). Produksi melalui sintesis mikroba lebih sederhana daripada produksi surfaktan sintetis kompleks (Cooper & Zajic 1980). Perkembangan bioteknologi mempercepat pengembangan metode biologi untuk memproduksi surfaktan dalam skala industri (Cameotra & Makkar 1998).

A. Klasifikasi Biosurfaktan

Tidak seperti surfaktan sintetis, biosurfaktan dikelompokkan menurut molekul aktif permukaan yang disintesis (Desai & Banat 1997), dan terutama dari komposisi kimia dan asal mikroba. Komposisi kimia terdiri atas struktur hidrofilik, antara lain: asam amino atau peptida anion atau kation, polisakarida, dan struktur hidrofobik yaitu hidrokarbon dan asam lemak (Cooper & Zajic 1980).

Sebagai contoh, lipopeptida yang dihasilkan *B. subtilis* mempunyai dua nama trivial, yaitu surfaktin dan subtilisin, sedangkan lichenysin A dari *B. licheniformis*. Produksi fosfolipida ditemukan di *Aspergillus sp.* dan *Thiobacillus thiooxidans*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Rhodobacter erythropolis* (Desai & Banat 1997).

B. Biosintesis Biosurfaktan

Dalam struktur ampifilik, sisi hidrofobik adalah asam lemak rantai panjang, hidroksi asam lemak, atau a-alkil b-hidroksi asam lemak, dan sisi hidrofilik adalah karbohidrat, asam karboksilat, fosfat, asam amino, peptida siklik, atau alkohol. Dua jalur metabolik primer yaitu hidrokarbon dan karbohidrat tercakup dalam sintesis hidrofobik dan hidrofilik. Jalur untuk sintesis dua kelompok prekursor ini beragam dan menggunakan seperangkat enzim spesifik.

C. Kinetika Produksi Biosurfaktan

Kinetika produksi biosurfaktan menunjukkan berbagai variasi di antara berbagai sistem. Parameter kinetika dapat dikelompokkan ke dalam tipe:

- i) Produksi yang berasosiasi dengan pertumbuhan, yaitu hubungan paralel antara pertumbuhan, penggunaan substrat, dan produksi biosurfaktan.
- ii) Produksi di bawah kondisi terbatas, dengan mereduksi faktor pembatasan pertumbuhan tertentu yaitu sebagai hasil pembatasan satu atau lebih komponen medium, hal ini dapat meningkatkan dengan tajam produksi biosurfaktan.
- iii) Produksi oleh sel mati, merupakan tipe produksi biosurfaktan yang tidak terjadi pada multiplikasi sel. Sel terus menggunakan sumber karbon untuk sintesis bio-surfaktan.
- iv) Produksi dengan penambahan prekursor, sebagai contoh penambahan senyawa lipofilik ke dalam kultur medium *T.magnoliae*, *T.bombicola*, dan *T.apicola*, menghasilkan peningkatan produksi biosurfaktan berkisar dari 120 - 150 mg/L.

III. METODOLOGI

A. Kinetika Pembentukan Biosurfaktan

Fermentasi biosurfaktan oleh kedua bakteri uji menggunakan medium formula menurut Zajic *et al.* (1977) yaitu dengan sumber karbon glukosa dan minyak mentah (hidrokarbon). Kinetika pembentukan surfaktan dianalisis dengan menumbuhkan isolat dalam medium fermentasi dengan masa inkubasi 120 jam dalam *shaker water bath* sentripetal pada suhu 50°C dan kecepatan pengocokan 80 rpm. Pengamatan dilakukan setiap 8 jam, meliputi jumlah populasi dengan metode *total plate count*, bobot biomassa dengan menentukan bobot kering sel, dan biosurfaktan yang terkandung. Perlakuan dilakukan dua kali ulangan.

B. Analisis Biosurfaktan

Analisis biosurfaktan mencakup analisis komposisi asam amino dan komposisi asam lemak. Analisis asam amino menggunakan HPLC Waters dengan suhu kolom 38°C, kecepatan alir sistem linear gradien, batas tekanan 3000 psi, fase gerak asetonitril 1% dan larutan penyangga natrium asetat 1M 40% dan detektor

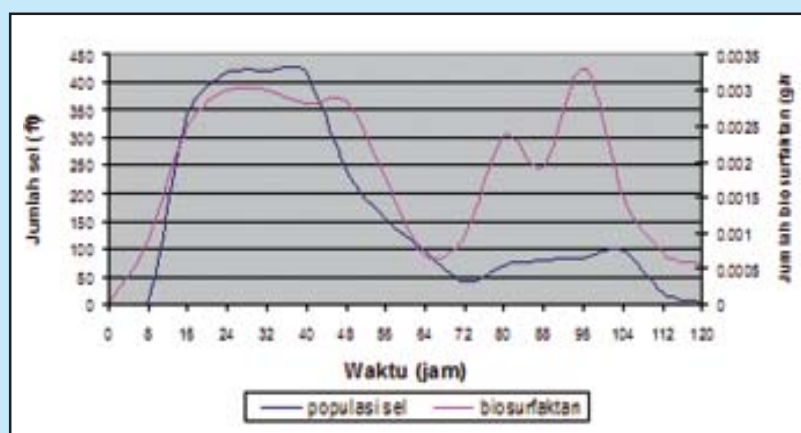
pada panjang gelombang 254 nm. Sampel dihidrolisis terlebih dahulu, kemudian dilarutkan dan disaring, sebagai standar asam amino digunakan dari E.Merck.

Analisis komposisi asam lemak dilakukan dengan metode metilasi *in-situ*, menggunakan gas kromatografi. Semua analisis karakterisasi biosurfaktan digunakan kontrol positif yaitu *Bacillus pumilus* JCM 2508, isolat dari *Japan Collection Microorganisms*.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kinetika Pembentukan Biosurfaktan

Sebagian besar biosurfaktan hampir selalu dikaitkan dengan pertumbuhan bakteri pada sumber karbon yang tidak larut air. Mikroorganisme mensekresi biosurfaktan ke lingkungan untuk pembasahan lapisan pada antarmuka (Neu 1996). Pada isolat *Providencia rettgeri* (Gambar 1), produksi biosurfaktan dimulai pada jam ke 8 yang merupakan fase lag pertumbuhan. Peningkatan produksi sesuai dengan kurva pertumbuhan, yaitu semakin banyak jumlah populasi sel semakin meningkat juga produksi biosurfaktannya, demikian juga pada penurunan produksinya, hingga pada jam ke 60. Media yang digunakan adalah campuran glukosa (15g/L) dan minyak mentah (18% berat) sebagai sumber karbon. Tentunya glukosa dimanfaatkan terlebih dahulu sampai habis, baru minyak mentahnya. Pada saat jumlah populasi sel menurun tajam justru terjadi kenaikan produksi hingga



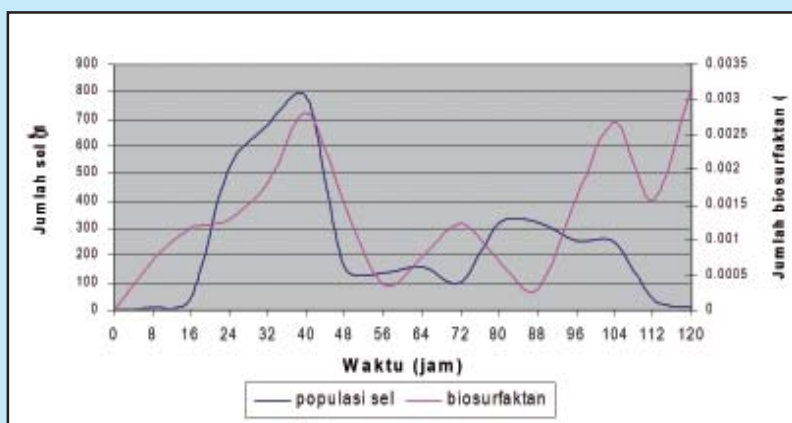
Gambar 1
Grafik jumlah sel dan produksi biosurfaktan
Providencia rettgeri vs lama inkubasi

0,003 g/mL. Hasil ini seperti juga pada pembentukan molekul emulsi yang dilepaskan dari permukaan sel secara ekstraseluler pada saat bakteri lapar (Neu 1996), produksi biosurfaktan oleh *Arthro-bacter paraffineus* ATCC 19558 dan *Corynebacterium lepus* yang ditumbuhkan pada medium dengan sumber karbon glukosa dan heksadekana (Desai dan Banat 1997). Produksi biosurfaktan berhenti ketika sel tidak mengalami penambahan lagi.

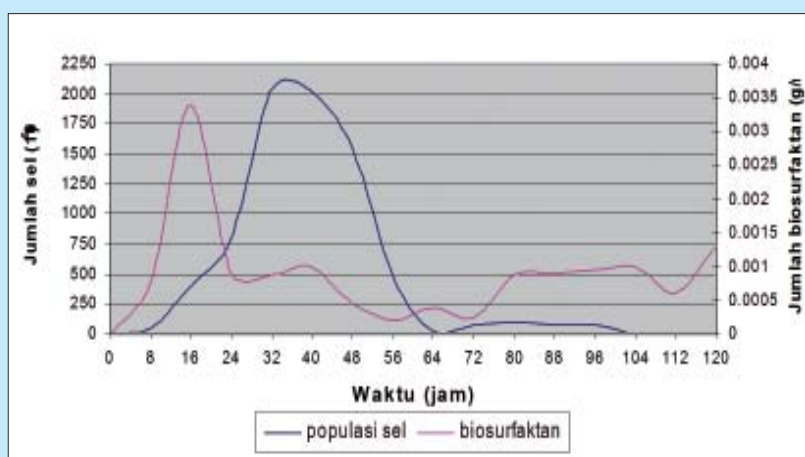
Pada isolat *Bacillus subtilis* biosurfaktan diproduksi mulai pada fase lag pertumbuhan dan terjadi peningkatan sesuai dengan pertumbuhan sel. Penurunan produksi biosurfaktan terjadi ketika jumlah sel juga mengalami penurunan, hasil ini terjadi hingga jam ke 60 (Gambar 2). Media yang digunakan sama dengan pada *Providencia rettgeri*. Akan tetapi dengan habisnya glukosa sebagai sumber karbon, kemudian menggunakan sumber karbon lain yaitu minyak mentah, produksi meningkat tajam dengan kecenderungan terus naik walaupun jumlah populasi sel mengalami penurunan. Hasil ini seperti pada isolat *Providencia rettgeri*. Bakteri penghasil biosurfaktan tumbuh efisien jika menggunakan substrat hidrokarbon dengan membentuk emulsi yang diperlukan untuk efisiensi pengangkutan substrat hidrokarbon ketika sel tumbuh pada substrat (Wagner *et al.* 1983).

Berbeda dengan *Providencia rettgeri*, biosurfaktan diproduksi sepanjang masa pertumbuhan selnya atau pada *Bacillus subtilis* biosurfaktan diproduksi sepanjang masa pertumbuhan dan meningkat ketika sel menggunakan sumber karbon

hidrokarbon. Sedangkan pada kontrol BP JCM 2508 produksi biosurfaktan meningkat pada fase logaritmik pertumbuhannya (Gambar 3). Produksi biosurfaktan menurun ketika sel memasuki fase stasioner. Hasil ini berbeda jika medium pertumbuhannya tidak menggunakan minyak mentah, produksi biosurfaktan meningkat seiring peningkatan bobot biomassa (Ismail 1998). Adanya minyak mentah pada media, menghambat produksi biosurfaktan karena *Bacillus pumilus* JCM 2508 tidak dapat menggunakan minyak mentah sebagai sumber karbon.



Gambar 2
Grafik jumlah sel dan produksi biosurfaktan *Bacillus subtilis* vs lama inkubasi



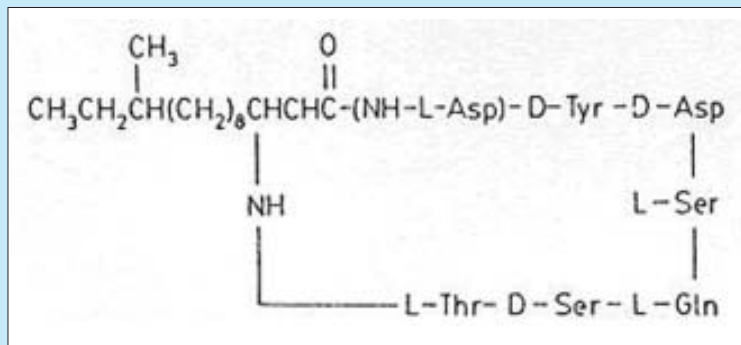
Gambar 3
Grafik jumlah sel dan produksi biosurfaktan kontrol *Bacillus pumilus* JCM 2508 vs lama inkubasi

Bobot biosurfaktan maksimal yang dihasilkan kedua isolat relatif lebih rendah dari hasil penelitian lain. Dalam Richana (1997) dapat diperoleh bobot maksimal 0,85 g/L dari isolat BMN58 yang diisolasi dari tanah tercemar minyak nabati. *Bacillus pumilus* JCM 2508 pada media NB dan suhu inkubasi 30°C menghasilkan 0,9 g/L (Ismail 2000), *Corynebacterium* sp. dalam medium Zajic (1997) menghasilkan 0,5 g/L (Margaritis 1979). Produksi biosurfaktan dipengaruhi oleh sumber karbon, khususnya karbohidrat yang digunakan, sumber nitrogen, dan faktor lingkungan. Sumber nitrogen organik seperti asam aspartat, asam glutamat, asparagin, dan glisin meningkatkan produksi biosurfaktan pada *Arthrobacter paraffineus*. Nitrat meningkatkan produksi biosurfaktan pada *Pseudomonas aeruginosa* dan *Rhodococcus* spp. Ketersediaan nitrogen yang terbatas justru memicu produksi biosurfaktan lebih tinggi pada *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida tropicalis*, dan *Nocardia*. Faktor lingkungan seperti pH, suhu, agitasi, dan oksigen berpengaruh pada produksi biosurfaktan yaitu mempengaruhi pertumbuhan sel atau aktivitasnya (Desai dan Banat 1997).

B. Analisis Biosurfaktan

Untuk mengetahui struktur kimia biosurfaktan yang dihasilkan dari *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* perlu dibandingkan dengan surfaktin (Gambar 4) sebagai standar yaitu lipopeptida antibiotik dan dikenal sebagai biosurfaktan yang sangat efisien.

Dengan menggunakan surfaktin (Sigma) sebagai standar analisis, diketahui bahwa biosurfaktan yang dihasilkan dari isolat *Providencia rettgeri* mempunyai struktur yang sama dengan surfaktin, dengan kandungan sebesar 22,09 ppm dan *Bacillus subtilis* sebesar 27,54 ppm, seperti disajikan pada Tabel 1. Dari hasil ini menunjukkan bahwa biosurfaktan yang



L- Asp : L-Asparagin; D - Tyr : D - Tirosin; L - Ser :
L - Serin; L - Gln : L - Glisin; L - Thr : L - Treonin

Gambar 4
Struktur surfaktin (Zajic at al. 1977)

Tabel 1
Analisis biosurfaktan dengan standar surfaktin

Analisis biosurfaktan	Isolat	
	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfaktin	22,09 ppm	27,54 ppm

dihasilkan kedua isolat termasuk dalam kelompok lipopeptida. Jenis-jenis senyawa aktif permukaan berperan dalam perbedaan proses fisiologi. Tidak hanya sifat-sifat intrinsik permukaan lipida atau protein tetapi juga faktor lingkungan, larutan, kelembapan, adanya kontak adhesi antara molekul dan permukaan lain, proses dinamik, dan lama waktu interaksi dengan permukaan (Neu 1996).

a. Analisis Komposisi Asam Amino Biosurfaktan

Asam amino dan derivatnya selain berperan sebagai penyusun protein, juga mempunyai berbagai fungsi penting secara biologis. Dua puluh asam amino mempunyai bermacam-macam sifat biokimia seperti polaritas, keasaman, kebasaan, aromatik, sisi aktif, fleksibilitas konformasi, kemampuan untuk memotong ikatan, kemampuan mengikat hidrogen, reaktivitas kimia, rantai samping bervariasi, ukuran, bentuk, muatan, kapasitas ikatan

hidrogen, dan reaktivitas kimia, yang umumnya ditemukan pada protein (Stryer 1995). Ikatan peptida atau kelompok asam amino merupakan bagian polar biosurfaktan yang menstabilkan *mikrobubbles* (D' Arrigo 1983).

Sebagian besar asam-asam amino mempunyai titik didih mendekati 300°C, namun turunan non ioniknya mendidih sekitar 100°C. Asam-asam amino, seperti senyawa ionik lainnya lebih larut dalam pelarut polar daripada pelarut non polar. Sebagian besar asam-asam amino sangat larut dalam air, tetapi sebagian besar tidak larut dalam pelarut organik (Voet & Voet 1995).

Komposisi asam amino penyusun biosurfaktan kedua isolat menunjukkan perbedaan dengan kontrol positif maupun dengan surfaktin baik dalam konsentrasi maupun jumlah jenisnya (Tabel 2). Asam amino prolin, metionin, sistin tidak ditemukan pada kontrol positif, sedangkan pada surfaktin tidak ditemukan prolin dan sistin.

Klasifikasi asam amino standar adalah menurut polaritas rantai samping (gugus R), karena bentuk protein melipat pada konformasi alam, sebagian besar cenderung merespon pergerakan sisi rantai-rantai hidrofobiknya kontak dengan air dan untuk melompat rantai samping hidrofilik. Berdasarkan hal tersebut asam amino dikelompokkan dalam 1) gugus R non polar; 2) gugus R rantai samping tidak bermuatan; 3) rantai samping bermuatan (Stryer 1995).

Asam amino gugus R non polar meliputi: glisin, alanin, valin, leusin, isoleusin, metionin, prolin, fenil alanin. Pada isolat *Providencia rettgeri* konsentrasi asam amino dengan gugus R non polar sebesar 6,28% sedang *Bacillus subtilis* 5,41%, kedua nilai ini lebih kecil dibandingkan dengan kontrol yaitu *Bacillus pumilus* JCM 2508 sebesar 7,82% maupun surfaktin sebesar 15,90%.

Asam amino gugus rantai samping tidak bermuatan meliputi serin, treonin, tirosin, dan sistin. Konsentrasi asam amino tidak bermuatan, biosurfaktan dari isolat *Providencia rettgeri* sebesar 2,28% sedangkan

Bacillus subtilis 1,96%, kontrol positif *Bacillus pumilus* JCM 2508 sebesar 2,60%, dan surfaktin 0,91%.

Asam amino rantai samping bermuatan, asam amino ini meliputi: lisin, arginin, histidin, asam aspartat, asam glutamat. Konsentrasi asam amino ini pada biosurfaktan isolat *Providencia rettgeri* sebesar 3,33% sedangkan *Bacillus subtilis* 3,17%, kontrol positif *Bacillus pumilus* JCM 2508 9,46%, dan surfaktin 10,41%.

Berdasarkan reaktivitas rantai samping dengan air, asam amino dapat bersifat suka air (hidrofilik) atau tidak suka air (hidrofobik) (Stryer 1995). Asam amino hidrofobik meliputi: glisin, alanin, valin, leusin, isoleusin, prolin, fenilalanin, tirosin, sistin dan metionin. Konsentrasi asam amino hidrofobik pada biosurfaktan *Providencia rettgeri* 7,88%, *Bacillus subtilis* 6,76%, kontrol positif 8,26% dan surfaktin 16,10%. Rantai samping hidrofobik asam amino berfungsi untuk menstabilkan bentuk tiga dimensi protein yang larut dalam air dengan cara menghindari kontak dengan air (Stryer 1995).

Asam amino yang bersifat hidrofilik yaitu: serin, treonin, lisin, arginin, histidin. Konsentrasi asam amino

Tabel 2
Hasil analisis komposisi asam amino biosurfaktan

No.	Jenis asam amino	Konsentrasi (%)			
		<i>P. rettgeri</i>	<i>B. subtilis</i>	Kontrol*	Surfaktin*
1.	Aspartat	0,431	0,371	2,1596	3,8916
2.	Glutamat	0,608	0,58	3,0573	4,6798
3.	Serin	0,437	0,456	0,9571	0,3204
4.	Glisin	0,477	0,442	1,7043	0,4016
5.	Histidin	0,52	0,498	0,4759	0,203
6.	Arginin	1,18	1,17	3,5661	1,0729
7.	Threonin	0,24	0,16	1,1947	0,3864
8.	Alanin	0,288	0,283	0,4174	0,2114
9.	Prolin	0,911	0,83	-	-
10.	Tirosin	1,058	1,02	0,4457	0,2018
11.	Valin	0,641	0,524	1,5556	3,1878
12.	Metionin	1,153	1,106	-	0,2526
13.	Sistin	0,54	0,325	-	-
14.	Isoleusin	0,934	0,518	1,2352	0,8217
15.	Leusin	0,75	0,688	1,7778	10,735
16.	Fenilalanin	1,13	1,019	1,1255	0,289
17.	Lisin	0,588	0,554	0,2034	0,5676

* = data sekunder (Ismail 1998)

hidrofilik pada biosurfaktan isolat *Providencia rettgeri* 2,97%, *Bacillus subtilis* 2,84%, kontrol positif *Bacillus pumilus* JCM 2508 6,40% dan surfaktin 2,55%.

Persentase asam amino dengan rantai samping hidrofobik pada kedua isolat lebih kecil daripada kontrol positif maupun surfaktin. Sebaliknya asam amino rantai samping hidrofilik kedua isolat lebih besar dari surfaktin tetapi masih lebih kecil dari kontrol. Interaksi rantai hidrofobik menentukan formasi agregat molekul surfaktan (Ulupagan *et al.* 2003), yang bertanggung jawab terhadap awal pelekatan pada antarmuka (Hermansson *et al.* 1982).

b. Analisis Komposisi Asam Lemak Biosurfaktan

Isolat *Providencia rettgeri* mempunyai komposisi asam lemak yang bila diurutkan dari konsentrasi tertinggi adalah: asam oleat, asam palmitat, asam stearat, asam miristat, asam linoleat, asam palmitoleat, dan asam linolenat (Tabel 3). Sedangkan kandungan asam lemak dalam isolat *Bacillus subtilis* adalah asam oleat, asam palmitat, asam linoleat, asam palmitoleat, asam linolenat, asam miristat, dan asam stearat. Asam lemak yang dihasilkan kedua isolat, terdapat tujuh macam dengan rantai karbon C14, C16, dan C18. Asam lemak rantai 18 mendominasi komposisi biosurfaktan pada kedua isolat (Tabel 3). Asam lemak ini sangat umum ditemukan pada membran bakteri (Madigan *et al.* 2000).

Terdapat empat asam lemak rantai karbon 18, satu diantaranya merupakan asam lemak jenuh yaitu asam stearat. Asam-asam lemak tidak jenuh pada biosurfaktan ini mempunyai titik leleh rendah yaitu asam palmitoleat (C16:1) dengan titik leleh -0,5°C, asam oleat (C18:1) dengan titik leleh 13,4°C, asam linoleat (C18:2) dengan titik leleh -9°C, dan asam linolenat (C18:3) dengan titik leleh -17°C, sifat leleh yang rendah berkaitan dengan reaktivitas yang tinggi sehingga sangat mempengaruhi fluiditas pada membran. Fluiditas lemak meningkat sesuai dengan tingkat ketidakjenuhan dari komponen residu asam lemaknya. Hal ini penting untuk sifat-sifat membran (Voet & Voet 1995). Sifat ini diperlukan pada proses EOR, yaitu pada daerah antarmuka minyak dengan

Tabel 3
Hasil analisis komposisi asam lemak biosurfaktan

No.	Jenis asam lemak	Isolat	
		<i>P. rettgeri</i> (%)	<i>B. subtilis</i> (%)
1	Asam miristat (C 14 : 0)	0,01856	0,013574
2	Asam palmitat (C 16 : 0)	0,059443	0,045295
3	Asam palmitoleat (C 16 : 1)	0,008626	0,022364
4	Asam stearat (C 18 : 0)	0,019732	0,013151
5	Asam oleat (C 18 : 1)	0,324193	0,249984
6	Asam linoleat (C 18 : 2)	0,008868	0,036948
7	Asam linolenat (C 18 : 3)	0,003102	0,015725

air formasi. Asam lemak rantai rangkap hampir selalu mempunyai konfigurasi cis. Hal ini menyebabkan kekakuan melipat 30° dalam rantai hidrokarbon asam lemak tak jenuh sehingga efisien menempati ruangan. Akibatnya menurunkan ikatan Van der Waals sehingga menyebabkan titik didih asam lemak menurun dengan tingkat ketidakjenuhan (Voet & Voet 1995).

Titik leleh asam lemak jenuh yang terdapat pada biosurfaktan yaitu asam palmitat (C16:0) 63,1°C dan asam stearat (18:0) 69,6°C. Titik leleh pada suhu ini masih merupakan kisaran suhu yang terdapat dalam reservoir sehingga pada keadaan tersebut asam-asam lemak belum membeku. Asam lemak jenuh adalah molekul dengan fleksibilitas tinggi, mempunyai kisaran luas konformasi karena adanya rotasi bebas secara relatif masing-masing ikatan C-C, energi minimum konformasi ini merupakan jumlah interferensi sterik dengan gugus metil di sampingnya. Akibatnya titik leleh asam lemak jenuh meningkat dengan peningkatan jumlah molekul (Voet & Voet 1995).

Kedua isolat mempunyai persentase asam lemak yang berbeda walaupun penyusun komposisi dua terbesar yaitu asam oleat dan asam palmitat diurutkan yang sama. Persentase penyusun asam lemak isolat *Providencia rettgeri* terdiri atas 77,91% asam lemak tak jenuh dan 22,09% asam lemak jenuh. Sedangkan isolat *Bacillus subtilis* tersusun dari 81, 86% asam lemak tak jenuh dan 18,14% asam lemak jenuh. Lipida merupakan struktur ujung dalam lapisan yang dengan cepat mengumpul pada antarmuka (Marshall 1980), hal ini mengindikasikan lipida terlibat dalam interkalasi antarmuka. Lipida juga mempunyai pengaruh pada adhesi mikroorganisme (Neu 1996).

Dari komposisi hidrofilik yaitu asam amino dan hidrofobik yaitu asam lemak pada molekul biosurfaktan di kedua isolat, dapat diketahui nilai *Hydrophilic Lipophilic Balance* (HLB) sebesar 10,94. Nilai HLB ini menunjukkan biosurfaktan mempunyai kecenderungan membentuk emulsi pada lapisan hidrofobik (Canaveri 1969). Pada penerapan MEOR lapisan hidrofobik berupa minyak mentah, sehingga biosurfaktan cenderung membentuk emulsi pada lapisan minyak mentah. Air tersebar sebagai gelembung halus di dalam fase minyak, seolah-olah saturasi minyak menjadi meningkat, dan pada saat melebihi saturasi kritis minyak akan mengalir (LEMIGAS 2001). Biosurfaktan akan membentuk lapisan mikroskopis pada antarmuka air dan minyak mentah, sifat lapisan mikroskopis ini menentukan struktur dan dinamika emulsi yang stabil (Langervin 1992).

V. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Peningkatan produksi biosurfaktan untuk *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* sesuai dengan peningkatan jumlah sel kedua bakteri (kurva pertumbuhan) dengan glukosa sebagai sumber karbon.
2. Biosurfaktan diproduksi kembali, setelah kedua bakteri memanfaatkan hidrokarbon yang juga sudah ada dalam media, sebagai sumber karbon.
3. Biosurfaktan yang dihasilkan dari isolat *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* mempunyai struktur yang sama dengan surfaktin dengan kandungan masing-masing sebesar 22,09 ppm dan 27,54 ppm.
4. Terdapat 17 asam amino dan 7 asam lemak dalam biosurfaktan yang dihasilkan *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis*.
5. Kandungan asam amino dalam biosurfaktan dari kedua bakteri sama dengan yang terdapat dalam surfaktin kecuali prolin dan sistin.

KEPUSTAKAAN

1. Cameotra, S.S. dan R.S. Makkar, 1998, "Synthesis of Biosurfactants in Extreme Condition", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50:520-529.
2. Cooper D.G. dan J.E. Zajic, 1980, "Surface Active Compounds from Micro-organisms", *Adv. Appl. Microbiol.*, 26:229-253.
3. D'Arrigo, J.S., 1983, *Glycoprotein Surfactant Stabilize Long-Lived Gas Microtubules*, di dalam Zajic, J.E., D.G. Cooper, T.R. Jack, N. Kosaric, Editor, *Microbial Enhanced Oil Recovery*, Oklahoma, PennWell Books.
4. Desai, J.D. dan I.M. Banat, 1997, "Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, [Review]", *Microbiol. Mol. Biol.*, 61:47-64.
5. Dunvnjak, Z., D.G. Cooper, N. Kosaric, 1982, "Production of Surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558", *Biotech. Bioeng.*, 24:165-175.
6. Hermansson, M., S. Kjelleberg, T.K. Korhonen, dan T.A. Stenstrom, 1982, "Hydro-phobic and Electrostatic Characterization of Surface Structure of Bacteria and Its Relationship to Adhesion to An Air-Water Interface", *Arch. Microbiol.*, 131:308-312.
7. Ismail, Y., 1998, Karakterisasi Biosurfaktan *Bacillus pumilus* JCM 2508, *Tesis*, Institut Pertanian Bogor, Program Pascasarjana.
8. Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker, *et al.* 2000, *Brock Biology of Microorganisms*, Edisi ke-9, New Jersey, Prentice Hall.
9. Margaritis, A., J.E. Zajic, D.F. Gerson, 1979, "Production and Surface Active Properties of Microbial Surfactant", *Biotech. Bioeng.*, 21:1151-1162.
10. Neu, T.R., 1996, "Significance of Bacterial Surface Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces", *Micro. Rev.*, 60:151-166.
11. Richana, N., 1997, "Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Bakteri Lokal Penghasil Biosurfaktan (Lipopeptida)", *Tesis*, Institut Pertanian Bogor, Program Pascasarjana.
12. Stryer, L., 1995, *Biochemistry*, Edisi ke-4, New York, W.H. Freeman and Company.
13. Voet, D. dan J. Voet, 1995, *Biochemistry*, Edisi ke-4, New York, John Wiley & Sons.
14. Wagner, F., U. Behrenat, H. Bock, A. Kretschmer, S. Lang, C. Syldatk, 1983, *Production and Chemical Characterization of Surfactant from Rhodococcus erythropolis and Pseudomonas sp.*, Mub Grown on Hydrocarbon, di dalam: Zajic, J.E., D.G. Cooper, T.R. Jack, N.

- Kosaric, editor *Microbial Enhanced Oil Recovery*, Oklahoma, PennWell Books.
15. Zajic, J.E., H. Guignard, D.F. Gerson, 1977, "Emulsifying and Surface Active Agents from *Corynebacterium hydrocarboclastus*", *Biotech. Bioeng.*, 19:1285-1301.
16. 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.