

# Seleksi Mikroba dan Nutrisi yang Berpotensi Menghasilkan Biosurfaktan untuk MEOR

Cut Nanda Sari dan Yanni Kussuryani

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Minyak dan Gas Bumi "LEMIGAS"

Jl. Ciledug Raya Kav. 109, Cipulir, Kebayoran Lama, Jakarta Selatan

Telepon: 62-21-7394422, Fax: 62-21-7246150

Email: cutnanda@lemigas.esdm.go.id; yannik@lemigas.esdm.go.id

Teregistrasi I tanggal 27 Mei 2013; Diterima setelah perbaikan tanggal 25 Juni 2013

Disetujui terbit tanggal: 30 Agustus 2013

## ABSTRAK

Biosurfaktan merupakan surfaktan yang dihasilkan oleh mikroba dari golongan bakteri hidrokarbonoklastik yang memiliki kemampuan menurunkan tegangan antar muka. Faktor keberhasilan dalam produksi biosurfaktan ditentukan dari jenis mikroba dan nutrisi yang digunakan. Kegiatan penelitian ini terdiri atas empat tahapan yaitu aktivasi dan kultivasi mikroba, seleksi mikroba penghasil biosurfaktan, kurva pertumbuhan mikroba, seleksi nutrisi. Aktivasi dan kultivasi mikroba dilakukan dalam tiga tahapan dengan masa inkubasi masing-masing tahapan yaitu 37°C selama 24 jam. Hasil seleksi mikroba penghasil biosurfaktan diperoleh tiga jenis mikroba dari tujuh mikroba yang diuji, berdasarkan indikasi luasnya zona lisis yang terbentuk pada media agar darah yaitu, BLCC B-3, BLCC B-4 dan BLCC B-5. Hasil uji lanjut terhadap ketiga mikroba tersebut pada media minyak dengan mengukur tegangan antar muka (IFT), menghasilkan dua mikroba dengan nilai IFT yang terendah yaitu BLCC B-3 dan BLCC B-5. Hasil *screening* nutrisi berdasarkan pengukuran Tegangan Antar Muka (IFT), Viskositas, *Total Plate Count* (TPC), dan pH, menunjukkan media BC-4 dan media PA-4 mendukung aktivitas mikroba dalam memproduksi biosurfaktan.

**Kata kunci:** seleksi mikroba, seleksi nutrisi, produksi biosurfaktan.

## ABSTRACT

*Biosurfactant is a surfactant derived from hydrocarbonoclastic bacteria which are capable to reduce surface tension. The successful biosurfactant productions are determined by nutrition and microbial species. This research consists of 4 main steps: activation and cultivation of microbes, microbial growth curves, screening of surfactant producing bacteria, and screening of nutrition. Microbial activation and cultivation conducted in 3 sequential cultivation in 24 hours incubation time at 37°C. Screening of surfactant producing bacteria from 7 microbial isolates obtained 3 isolates which show positive result based on diameter of hemolytic area on blood agar. They are BLCC B-3, BLCC B-4 and BLCC B-5. The interfacial tension (IFT) examination result from these 3 isolates showed that BLCC B-3 and BLCC B-5 had the lowest IFT value. The result of nutrition screening based on IFT, viscosity, Total Plate Count, and pH show that BC-4 and PA-4 media are the best composition of media that support the microbes in producing surfactants.*

**Keywords:** *microbe screening, nutrition screening, biosurfactant production.*

## I. PENDAHULUAN

Di beberapa negara telah dilakukan penelitian untuk menguras sisa cadangan minyak dengan teknik produksi tersier menggunakan surfaktan. Surfaktan ini dirancang khusus untuk mengeluarkan

minyak dari formasi geologi dengan menurunkan tegangan antarmuka minyak-air yang merupakan parameter utama dalam EOR (Lake 1989; Fox *et al.*, 1993). Nilai tegangan antarmuka antara minyak dan air yang rendah (*ultra low*), dapat diperoleh dengan menggunakan senyawa aktif permukaan

yang berasal dari produk mikroba. Senyawa tersebut biasa disebut dengan biosurfaktan. Teknik ini merupakan suatu langkah maju karena sangat potensial untuk memperoleh sisa-sisa minyak dari reservoir (Ban & Kato, 1993). Oleh karena itu perlu diproduksi biosurfaktan dengan sistematisa pengolahan yang cermat dengan mikroba yang tepat. Untuk mendapatkan mikroba yang potensial, perlu dilakukan suatu penelitian seleksi mikroba penghasil biosurfaktan dan seleksi nutrisi pendukung aktivitas metabolisme mikroba penghasil surfaktan.

### A. Deskripsi Biosurfaktan

Biosurfaktan adalah senyawa aktif permukaan ekstraselular yang disekresi sel-sel mikroba yang ditumbuhkan pada hidrokarbon tertentu, juga memungkinkan dihasilkan dari substrat lain seperti karbohidrat (Chopinean *et al.*, 1988). Keutamaan kultur mikroba adalah kemampuannya mengekskresi relatif besar atau substansi aktif permukaan yang mengemulsi, atau membasahi fase hidrokarbon sehingga pembuatannya tersedia untuk absorpsi selular (Margaritis *et al.*, 1979).

Biosurfaktan terdiri dari molekul-molekul hidrofilik dan hidrofobik seperti halnya surfaktan kimia. Biosurfaktan mempunyai sifat yang sama seperti surfaktan sintetik dengan berbagai karakteristik, sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan udara-air, dan tegangan antarmuka dalam cairan-cairan misalnya minyak dan air dan cairan-padatan. (Jack, 1993). Biosurfaktan dapat membentuk partikel-partikel misel, pengemulsi hidrokarbon, dan mengubah karakteristik permukaan batuan.

Daya tarik biosurfaktan meningkat akhir-akhir ini karena sangat potensial menurunkan tegangan antarmuka pada konsentrasi rendah dan homogen (Cooper & Zajic, 1980), sangat bervariasi sehingga luas fungsinya, ramah lingkungan, disintesis oleh beragam mikroba, kemungkinan memproduksinya melalui fermentasi. Potensinya dapat diterapkan untuk perlindungan lingkungan, *recovery* minyak, kesehatan, dan proses industri makanan. Hal yang terpenting adalah diterima lingkungan karena terdegradasi dengan cepat dan mempunyai toksisitas yang rendah daripada surfaktan sintetik (Margaritis *et al.*, 1979; Chopinean *et al.*, 1988; Desai & Banat, 1997). Produksi melalui sintesis mikroba lebih sederhana daripada produksi surfaktan sintetik (Cooper & Zajic, 1980). Perkembangan bioteknologi

mempercepat pengembangan metode biologi untuk memproduksi surfaktan dalam skala industri.

### B. Biosintesis Biosurfaktan

Dalam struktur amphifilik, sisi hidrofobik adalah asam lemak rantai panjang, hidroksi asam lemak, atau  $\alpha$  alkil ( $\beta$ -hidroksi asam lemak, dan sisi hidrofilik 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. Dalam berbagai kasus, enzim pertama untuk sintesis prekursor ini adalah enzim regulator, oleh karena itu di samping keragaman, ada beberapa kesamaan umum sintesis dan regulasinya. Kemungkinan sintesis sisi hidrofobik dan sisi hidrofilik yang berbeda dari biosurfaktan dan ikatannya adalah: i) hidrofilik dan hidrofobik disintesis secara *de novo* oleh dua jalur yang independen; ii) hidrofilik disintesis *de novo* sedangkan sintesis hidrofobik diinduksi oleh substrat; iii) hidrofobik disintesis *de novo*, sedangkan sintesis hidrofilik tergantung substrat; iv) sintesis hidrofobik dan hidrofilik tergantung substrat (Desai & Banat, 1997).

### 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 yang paralel antara pertumbuhan, penggunaan substrat dan produksi biosurfaktan. Produksi biosurfaktan paralel dengan pertumbuhan pada substrat hidrokarbon dan non hidrokarbon selama fase pertumbuhan eksponensial, namun produksi *emulsifier* terus berlanjut setelah pertumbuhan berhenti (Rosenberg *et al.*, 1979). Produksi rhamnolipida oleh beberapa *Pseudomonas spp*, glikoprotein AP-6 oleh *Pseudomonas fluorescent* 378, zat aktif permukaan oleh *Bacillus cereus* IAF 346, dan biodispersan oleh *Bacillus sp* galur IAF-343 adalah contoh produksi biosurfaktan yang berasosiasi dengan pertumbuhan (Desai & Banat, 1997);
- ii) Produksi di bawah kondisi terbatas. Produksi di bawah kondisi pembatasan pendukung

pertumbuhan, mempunyai karakteristik peningkatan yang tajam dalam produksi biosurfaktan sebagaimana hasil pembatasan satu atau lebih komponen medium. Penelitian menunjukkan produksi biosurfaktan yang berlebihan oleh *Pseudomonas spp* jika kultur telah mencapai fase stasioner karena keterbatasan nitrogen dan besi (Desai & Banat, 1997);

- iii) Produksi oleh sel mati. Produksi oleh sel mati merupakan tipe produksi biosurfaktan yang tidak terjadi multiplikasi sel. Sel terus menggunakan sumber karbon untuk sintesis biosurfaktan. Contoh tipe ini rhamnosa dari *Pseudomonas spp*, dan *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6, *sphorolipida* oleh *Torulopsis bombicola*, dan *Candida apicola*, *cellobiolipida* oleh *Ustilago maydis*, *tre-halosa tetraester* oleh *Rhodococcus erythropolis*, *lipida mannosilerithritol* oleh *Candida antartica*. Biosurfaktan yang diproduksi oleh sel-sel mati sangat menguntungkan untuk mengurangi biaya pemanenan produk, karena fase pertumbuhan dan fase pembentukan produk dapat dipisahkan (Desai & Banat, 1997);
- iv) Produksi dengan penambahan prekursor. Berbagai penelitian telah dipublikasikan, bahwa penambahan prekursor biosurfaktan ke dalam medium menyebabkan perubahan secara kualitatif dan kuantitatif dalam produksi. Sebagai contoh penambahan senyawa lipofilik ke dalam kultur medium *T. magnoliae*, *T. bombicola*, dan *T. apicola* IMET 43747, menghasilkan peningkatan produksi biosurfaktan dengan hasil kurang lebih 120-150 mg/l, Hal yang sama, peningkatan produksi biosurfaktan yang mengandung monosakarida, disakarida, atau trisakarida yang berbeda terjadi pada *Arthrobacter paraffmeus* DSM 2567, *Corynebacterium spp*, *Nocardia spp*, dan *Brevibacterium spp* dengan penambahan gula dalam medium pertumbuhan (Desai & Banat, 1997).

## II. TAHAPAN PENELITIAN

### A. Aktivasi dan Kultivasi Biakan Mikroba

Aktivasi mikroba dilakukan bertujuan untuk mengaktifkan biakan mikroba yang akan digunakan dalam percobaan. Aktivasi pertama dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni mikroba ke dalam tabung reaksi yang telah berisikan masing-

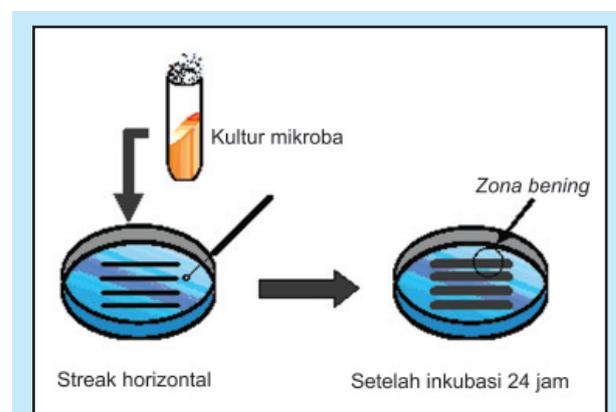
masing 10 mL media NB, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivasi kedua dilakukan dengan menginokulasikan 1 mL kultur aktivasi pertama ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 mL NB baru, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivasi ketiga dilakukan sama halnya seperti aktivasi pertama dan kedua, yaitu dengan cara menginokulasikan 10 mL biakan kultur aktivasi kedua ke dalam erlenmeyer 200 mL yang telah berisi 90 mL medium NB, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur biakan mikroba yang telah aktif kemudian dikultivasi.

Kultivasi biakan mikroba pada prinsipnya sama seperti yang dilakukan pada saat aktivasi biakan mikroba, hanya saja media dan kultur cair mikroba yang digunakan dalam volume besar. Kultivasi dilakukan bertujuan untuk mendapatkan stok kultur aktif mikroba dalam jumlah optimum. Kultur mikroba yang telah dikultivasi selanjutnya dapat digunakan dalam percobaan dan pembuatan kurva tumbuh.

### B. Seleksi Mikroba Penghasil Biosurfaktan

Seleksi atau penapisan mikroba dilakukan dengan tujuan mendapatkan mikroba yang potensial menghasilkan biosurfaktan, dilakukan dalam dua tahapan. Tahapan pertama yaitu uji awal pada media agar darah, dan tahapan kedua uji lanjut pada media minyak. Melalui uji awal pada media agar darah ini dapat diamati mikroba-mikroba yang menghasilkan biosurfaktan melalui indikasi adanya zona bening pada permukaan agar darah (Gambar 1).

Uji lanjut pada media minyak dilakukan untuk mengamati pengaruh biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba terhadap tegangan antar muka antara



**Gambar 1**  
Skema kerja seleksi mikroba pada media agar darah

fase minyak dan fase media. Tahapan kerja pada kegiatan ini adalah sebagai berikut: pertama dipilih mikroba-mikroba dengan luas zona bening terluas dari tahapan kegiatan seleksi mikroba menggunakan agar darah. Mikroba-mikroba terpilih ini kemudian dikultivasi untuk mendapatkan stok kultur yang optimum. Setelah kultivasi dilakukan selanjutnya mikroba ditumbuhkan pada media yang telah dicampur minyak. Percobaan ini diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 37°C dan pengukuran tegangan antar muka (IFT) dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-7 pengamatan.

### C. Kurva Pertumbuhan Mikroba

Kurva pertumbuhan menggambarkan pertumbuhan mikroba di dalam suatu kultur. Kurva tumbuh dibuat dengan metode cawan hitung *Total Plate Count* (TPC). Biakan mikroba yang telah diaktivasi diambil sebanyak 15 mL dengan *Optical Density* (OD)  $\pm 0,5$  ( $10^6$  sel/mL). Kemudian dimasukkan ke dalam dua erlenmeyer 500 mL yang berisikan masing-masing 285 mL medium NB. Pembuatan kurva tumbuh dimulai dengan mengukur OD setiap 2 jam selama 24 jam menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm, dilanjutkan dengan menghitung koloni mikroba. Sebelum pengukuran kurva tumbuh dimulai, OD mikroba diukur terlebih dahulu menggunakan spektrofotometer. Biakan mikroba yang digunakan dalam pembuatan kurva tumbuh memiliki OD 0,08 sampai 0,1. (Cappucino dan Sherman, 1987).

Perhitungan koloni dilakukan dengan membuat seri pengenceran dalam akuades. Satu mL biakan dicuplik dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisikan 9 mL akuades sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-1}$ . Pengenceran  $10^{-2}$  dilakukan dengan memindahkan 1 mL dari pengenceran  $10^{-1}$  ke dalam tabung reaksi yang berisikan 9 mL akuades. Proses ini terus dilakukan hingga diperoleh pengenceran  $10^{-13}$ . Penanaman biakan dilakukan secara duplo, dengan cara 1 mL dari masing-masing pengenceran tersebut disebar dengan menggunakan triglaski ke dalam cawan petri yang berisi 10 mL medium *Nutrient Agar* (NA) steril. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung sesuai dengan aturan perhitungan untuk metode cawan hitung. Data yang dimasukkan dalam perhitungan adalah yang memenuhi persyaratan 30-300 koloni

dalam satu cawan. Asumsi dasar dari perhitungan ini adalah satu koloni berasal dari satu sel bakteri.

Penentuan umur inokulum yang terbaik dilakukan dengan menghitung laju pertumbuhan dari *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*. Laju pertumbuhan dihitung dengan menggunakan rumus (Fardiaz, 1992):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{(T_t - T_0)}$$

dengan  $N_t$  adalah jumlah sel pada waktu  $t$ ,  $N_0$  adalah jumlah sel awal,  $T_t$  adalah waktu  $t$  dan  $T_0$  adalah waktu awal. Umur inokulum terbaik ditunjukkan oleh waktu dengan laju pertumbuhan mikroba yang tertinggi.

### D. Seleksi Nutrisi

Seleksi nutrisi memiliki tujuan memilih nutrisi yang potensial mendukung aktivitas metabolisme mikroba memproduksi biosurfaktan. Kegiatan ini dilakukan setelah seleksi mikroba, karena mikroba hasil seleksi akan digunakan dalam tahapan kegiatan ini. Nutrisi yang digunakan yaitu media BC untuk mikroba BLCC B-3 dan media PA untuk mikroba BLCC B-5. Media BC dan PA masing-masing terdiri dari lima formulasi. Formulasi dirancang berdasarkan kombinasi antara penggunaan variasi konsentrasi *Mineral Salt Medium* (MSM) 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, dan penggunaan media spesifik mikroba BLCC B-3 dan media spesifik BLCC B-5 (Tabel 1).

Parameter yang digunakan terdiri dari pengukuran pH, Populasi Bakteri/*Total Plate Count* (TPC), Tegangan Antar Muka/*Interfacial Tension* (IFT), dan Viskositas. Pengamatan dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-7.

## III. HASIL UJI DAN PEMBAHASAN

### A. Aktivasi dan Kultivasi Biakan Mikroba

Aktivasi mikroorganisme pada medium NB menunjukkan pertumbuhan mikroba sudah dapat diamati setelah masa inkubasi 24 jam. Setelah kultur mikroba yang digunakan berada dalam kondisi aktif, maka kultur siap digunakan sebagai inokulum atau stok kultur untuk percobaan dan pembuatan kurva tumbuh. Berdasarkan kurva pertumbuhan dapat diketahui umur mikroba terbaik untuk digunakan dalam proses fermentasi.

## B. Hasil Seleksi Mikroba

### 1. Hasil Uji pada Media Agar Darah

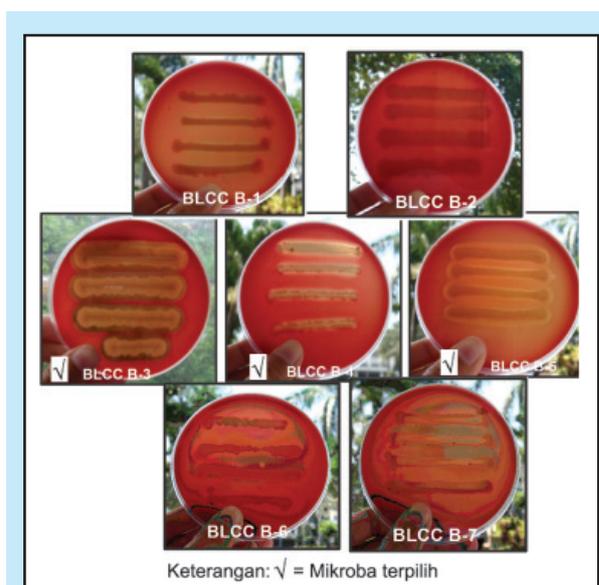
Metode hidrolisis agar darah merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya biosurfaktan yang dihasilkan oleh suatu mikroba, yaitu dengan indikasi terbentuknya zona hidrolisis (zona lisis) di sekeliling koloni. Metode hidrolisis agar darah dilakukan dengan mengacu pada surfaktan yang merupakan biosurfaktan yang potensial dari kelompok antibiotik lipopeptida yang menyebabkan lisis sel-sel eritrosit dan penghambat pembekuan darah (Anonim, 2004). Gambar 2 menunjukkan pembentukan zona hidrolisis yang dihasilkan oleh mikroba pada percobaan ini.

Berdasarkan Gambar 2 dan Tabel 2 memperlihatkan pembentukan diameter zona bening (*clear zone*) terbesar pada isolat BLCC B-3 diikuti BLCC B-5 dan BLCC B-4. Sementara BLCC B-1, BLCC B-2, BLCC B-6, dan BLCC B-7 juga memperlihatkan zona bening, namun diameternya tidak sebesar BLCC B-3, BLCC B-4, dan BLCC B-5. Dari uji mikroba pada agar darah, dipilih tiga jenis mikroba yaitu BLCC B-3, BLCC B-4, dan BLCC B-5. Terhadap tiga mikroba yang dipilih ini selanjutnya dilakukan uji lanjut pada media minyak.

### 2. Hasil Uji Pada Media Minyak

Hasil uji pada media minyak dari aktivitas biosurfaktan mengakibatkan menurunnya tegangan antar muka/*interfacial tension* (IFT) mikroba BLCC B-3 dari 7.43 mN/m menjadi 2.15 mN/m. Begitu juga halnya dengan mikroba BLCC B-5, tegangan antar muka turun dari 7.15 mN/m menjadi 2.75 mN/m. Sementara itu mikroba BLCC B-4 juga menunjukkan penurunan tegangan antar muka, akan tetapi penurunan yang terjadi tidak setinggi BLCC B-3 dan BLCC B-5 yaitu dari 7.10 mN/m turun menjadi 5.25 mN/m (Tabel 3). Dengan demikian dari hasil percobaan seleksi mikroba penghasil biosurfaktan, diperoleh dua mikroba potensial yaitu BLCC B-3 dan BLCC B-5 yang selanjutnya akan digunakan dalam percobaan seleksi nutrisi.

Selama proses metabolisme, mikroorganisme penghasil biosurfaktan mampu membentuk emulsi dari senyawa-senyawa hidrofobik yang larut dalam air. Emulsi yang dihasilkan berbentuk misel-misel atau gelembung-gelembung yang bertahan cukup lama sebelum pecah kembali tergantung



**Gambar 2**  
Pembentukan zona hidrolisis pada medium agar darah

**Tabel 1**  
Formulasi media mikroba BLCC B-3 dan BLCC B-5

Konsentrasi MSM (%)	Formulasi BLCC B-3	Formulasi BLCC B-5
5	BC-1	PA-1
10	BC-2	PA-2
15	BC-3	PA-3
20	BC-4	PA-4
25	BC-5	PA-5

**Tabel 2**  
Ketebalan zona hidrolisis yang terbentuk pada medium agar darah

No.	Sampel	Pembentukan Zona Hidrolisis
1.	BLCC B-1	++
2.	BLCC B-2	++
3.	BLCC B-3	+++++++
4.	BLCC B-4	++++
5.	BLCC B-5	++++
6.	BLCC B-6	+++
7.	BLCC B-7	++

Keterangan: ++ = Luas pembentukan zona bening

kestabilannya. Kemampuan biosurfaktan untuk membentuk misel serta menempati antar permukaan berpengaruh terhadap turunnya nilai tegangan permukaan (IFT).

Jumlah gelembung misel yang semakin banyak menunjukkan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan

semakin banyak jumlahnya, sedangkan semakin lama gelembung misel bertahan setelah pengocokan menunjukkan tingkat kestabilan emulsi yang dihasilkan semakin tinggi. Untuk aplikasinya di lapangan turunnya tegangan antar muka minyak dengan air, menyebabkan tekanan kapiler yang bekerja pada daerah penyempitan pori-pori batuan reservoir akan berkurang, sehingga sisa minyak yang terperangkap dalam pori-pori batuan mudah didesak dan dapat dikeluarkan (Desai & Banat, 1997).

### C. Kurva Pertumbuhan Mikroba

Kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan optimum dan pembentukan optimum metabolit yang dihasilkan oleh suatu mikroba. Pada saat mikroba sangat aktif dalam metabolisme atau memiliki aktivitas sel tertinggi umumnya terjadi pada fase logaritmik. Penggunaan inokulum sesuai kondisi tersebut diatas menyebabkan akan menggunakan substrat pada awal fermentasi sehingga tidak membutuhkan waktu adaptasi. (Maldonado, 1975 dalam Rosdyana, 2004).

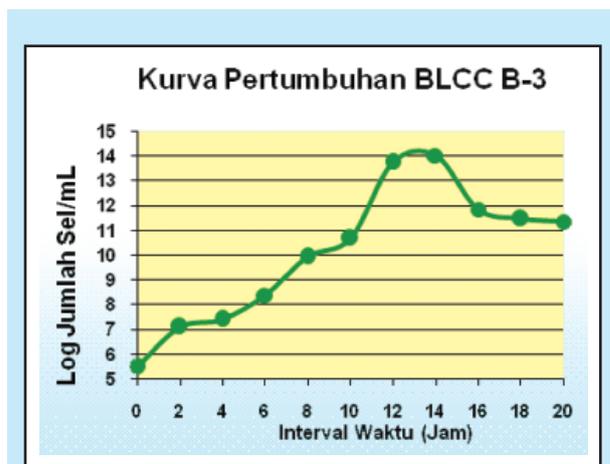
Kurva pertumbuhan BLCC B-3 (Gambar 3) tidak menunjukkan adanya fase adaptasi. Mikroba BLCC B-3 dapat tumbuh dengan baik pada medium pertumbuhan yang digunakan dan mampu menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan yang ada (Fardiaz, 1992). Bakteri dalam medium tersebut akan langsung menggunakan substrat, dan aktif mensintesis enzim-enzim yang dibutuhkan untuk pertumbuhan (Widiyanti, 2002).

Pertumbuhan mikroba BLCC B-3 terlihat dalam fase logaritmik, pertumbuhan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti kandungan nutrisi, pH, kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Selama fase logaritmik mikroba tumbuh dengan laju pertumbuhan maksimum ( $\mu$ m). Laju pertumbuhan

maksimum berbeda-beda tergantung pada: 1) spesies mikroba, 2) kondisi kultur dan 3) panjang rantai molekul substrat (Rachman, 1989). Fase logaritmik kurva tumbuh mikroba BLCC B-3, ditunjukkan dari jam ke-0 sampai jam ke-14, kemudian dilanjutkan dengan fase stasioner. Fase stasioner merupakan fase dimana semua sel mikroba berhenti membelah atau bila sel yang hidup dan sel yang mati mencapai keseimbangan (Fardiaz, 1992). Berdasarkan kurva pertumbuhan umur inokulum mikroba BLCC B-3 yang paling baik digunakan sesuai percobaan yaitu 14 jam.

Pada kurva pertumbuhan mikroba BLCC B-5 terlihat adanya fase adaptasi singkat pada jam ke-0 hingga jam ke-4 (Gambar 4). Menurut Fardiaz (1992) lamanya fase adaptasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

- 1) medium dan lingkungan pertumbuhan. Jika medium dan lingkungan pertumbuhan sama



**Gambar 3**  
Kurva pertumbuhan mikroba BLCC-3 dalam medium NB  
Kondisi lingkungan:  
suhu 37°C, pH awal medium 6,8

**Tabel 3**  
Analisis tegangan antar muka (*interfacial tension*) mikroba penghasil biosurfaktan

Jenis Mikroba	Interfacial Tension (mN/m)		
	Hari ke-0	Hari ke-7	Persentase Penurunan
BLCC B-3	7.43	2.15	71%
BLCC B-4	7.10	5.25	26%
BLCC B-5	7.15	2.75	61%

seperti medium dan lingkungan pertumbuhan yang digunakan sebelumnya, fase adaptasi terjadi dalam waktu singkat atau bahkan tidak diperlukan. Jika kondisi lingkungan dan nutrisi berbeda dengan yang digunakan sebelumnya, maka diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesis enzim-enzim.

- jumlah inokulum. Semakin tinggi jumlah awal sel mikroba yang digunakan maka akan mempercepat fase adaptasi. Sementara itu menurut Rachman (1989), lamanya fase adaptasi sangat tergantung dari kondisi fisiologi mikroorganisme yang digunakan.

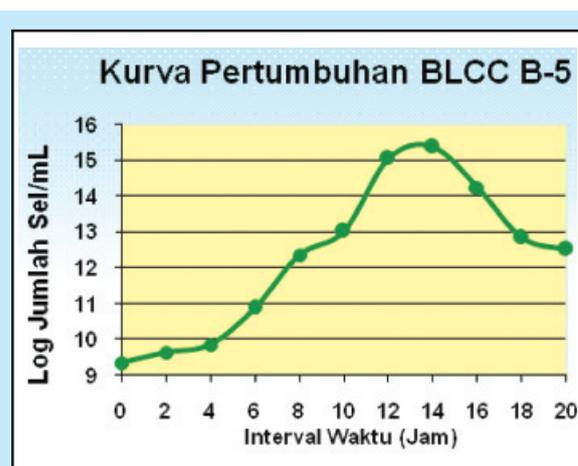
Pada penelitian ini jumlah mikroba BLCC B-5 yang digunakan belum optimum, hal ini terlihat dari saat dimulainya siklus pertumbuhan, mikroba membelah dengan kecepatan rendah. Namun selanjutnya mikroba mulai aktif membelah, terlihat pada jam ke-4 hingga jam ke-14 terjadinya fase logaritmik dan kemudian diikuti dengan fase kematian. Lama fase adaptasi yang terjadi pada kurva pertumbuhan BLCC B-5 terjadi tidak begitu lama, hal ini menandakan mikroba telah aktif membelah. Berdasarkan hasil pengujian ini, umur inokulum mikroba BLCC B-5 yang paling baik digunakan yaitu 14 jam. Bila dibandingkan antara pertumbuhan BLCC B-5 dengan BLCC B-3, pertumbuhan BLCC B-3 lebih baik karena tidak mengalami fase adaptasi.

### C. Hasil Seleksi Nutrisi

Nutrisi merupakan faktor penting pendukung aktivitas metabolisme, karena ketersediaan nutrisi yang diperlukan berpengaruh terhadap proses pembelahan sel mikroba dan produktivitas biosurfaktan. Untuk itu formulasi nutrisi yang tepat dan sesuai sangat diperlukan.

Berdasarkan hasil analisis terhadap beberapa parameter selama 7 hari inkubasi seperti terlihat pada Tabel 4, menunjukkan formula nutrisi BC-4 terbaik untuk pertumbuhan mikroba BLCC B-3. Hasil analisis IFT yang mempunyai korelasi dengan produksi biosurfaktan, memperlihatkan penurunan tertinggi yaitu mencapai 80%. Kondisi ini menunjukkan adanya produksi biosurfaktan yang signifikan. Penurunan IFT diikuti dengan menurunnya viskositas mencapai 67%. Dalam pertumbuhan tersebut juga dihasilkan produk lain yaitu bioasam, ditandai dengan adanya penurunan pH sekitar 31%. Bioasam pada kisaran tertentu dapat membantu memperbesar porositas batuan reservoir.

Sementara itu dari hasil TPC mikroba BLCC B-3 dengan nutrisi BC-4 menunjukkan peningkatan



**Gambar 4**  
Kurva Pertumbuhan Mikroba BLCC B-5 dalam medium NB  
Kondisi lingkungan:  
suhu 37°C, pH awal medium 6,8

**Tabel 4**  
Hasil analisis untuk melihat pengaruh aktivitas mikroba BLCC B-3 terhadap variasi formula nutrisi

Jenis Nutrisi (BLCC B-3)	pH			Viskositas (mPas)			Interfacial Tension (IFT) (mN/m)		
	Hari ke-0	Hari ke-7	% Penurunan	Hari ke-0	Hari ke-7	% Penurunan	Hari ke-0	Hari ke-7	% Penurunan
BC - 1	8.73	7.43	14	5.36	3.68	31	2.12	1.33	37
BC - 2	8.23	7.22	12	5.45	3.48	36	2.56	1.39	45
BC - 3	7.36	6.01	18	5.12	2.67	47	2.60	0.65	75
<b>BC - 4</b>	<b>7.76</b>	<b>5.33</b>	<b>31</b>	<b>5.77</b>	<b>1.89</b>	<b>67</b>	<b>2.45</b>	<b>0.48</b>	<b>80</b>
BC - 5	7.34	5.12	30	5.43	3.95	27	2.76	0.67	75

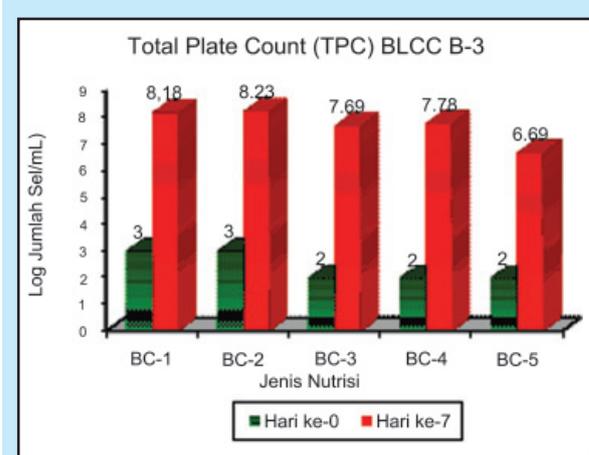
populasi mikroba dari log jumlah sel 2 sel/mL menjadi log jumlah sel 7.78 sel/mL (Gambar 5). Peningkatan populasi mikroba dalam media BC-4 tertinggi bila dibandingkan dengan nutrisi yg lain. Dalam kegiatan lebih lanjut formula nutrisi BC-4 berpotensi mendukung pertumbuhan populasi mikroba BLCC B-3 dalam produksi biosurfaktan.

Berdasarkan hasil analisis seperti terlihat pada Tabel 5 dan Gambar 6, menunjukkan media PA-1 tidak baik untuk pertumbuhan mikroorganisme BLCC B-5. Hal ini ditandai dengan pertumbuhan mikroorganismenya cenderung menurun. Namun dalam kondisi pertumbuhan tidak baik, terjadi penurunan IFT mencapai 55% dan peningkatan viskositasnya 44%. Dalam kondisi demikian mikroorganisme dapat mensintesis berbagai enzim untuk aktivitas metabolismenya. Produk yang bersifat surfaktan dihasilkan dalam kondisi tersebut, disamping itu dapat juga dihasilkan produk ekstraseluler seperti polisakarida yang dapat meningkatkan viskositas liquid media dilingkungannya.

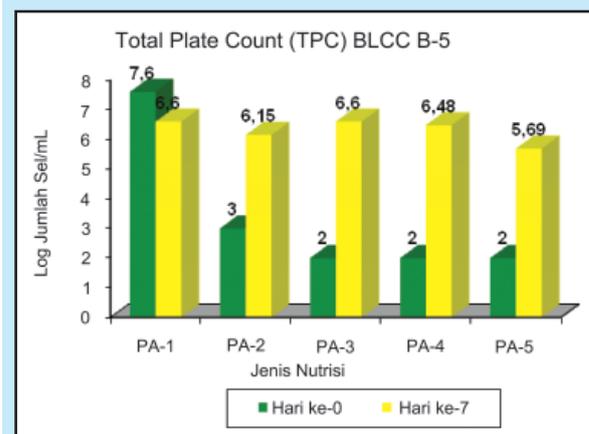
Mikroorganisme BLCC B-5 tumbuh dan berkembang biak dengan baik dalam media PA-3 dan PA-4, dan selama 7 hari inkubasi pertumbuhannya tidak berbeda jauh dalam kedua media tersebut. Pada periode waktu tersebut terjadi penurunan IFT maupun viskositas yang cukup tinggi. Dalam kaitannya dengan penurunan IFT, walaupun perbedaan tidak mencolok namun dalam media PA-4 lebih baik dari pada media PA-3. Dengan demikian media PA-4 dipilih sebagai media mikroba BLCC B-5 untuk penelitian lebih lanjut.

Sementara itu hasil TPC mikroba BLCC B-5 pada nutrisi PA-4 menunjukkan peningkatan populasi mikroba dari log jumlah sel 2sel/mL menjadi log jumlah sel 6.48sel/mL (Gambar6). Peningkatan

populasi merupakan indikasi adanya pertumbuhan mikroba. Menurut Fardiaz (1992), pertumbuhan dapat



**Gambar 5**  
Uji populasi mikroba BLCC B-3 pada beberapa variasi nutrisi



**Gambar 6**  
Uji populasi mikroba BLCC B-5 pada beberapa variasi nutrisi

**Tabel 5**  
Hasil analisis untuk melihat pengaruh aktivitas mikroba BLCC B-5 terhadap variasi formula nutrisi

Jenis Nutrisi (BLCC B-5)	Viskositas (mPas)			Interfacial Tension (IFT) (mN/m)		
	Hari ke-0	Hari ke-7	% Penurunan	Hari ke-0	Hari ke-7	% Penurunan
PA - 1	7.20	6.96	3	2.41	3.48	44% *
PA - 2	7.38	7.29	1	3.45	3.78	9 *
PA - 3	6.94	6.35	8	3.33	3.21	3
<b>PA - 4</b>	<b>6.73</b>	<b>5.76</b>	<b>14</b>	<b>3.21</b>	<b>3.14</b>	<b>2</b>
PA - 5	5.85	5.30	9	3.17	3.08	2

Keterangan: \*Presentase naik

didefinisikan sebagai penambahan secara teratur semua komponen di dalam sel hidup. Pada organisme uniselular (bersel tunggal), pertumbuhan merupakan penambahan jumlah sel yang berarti juga penambahan jumlah organisme, misalnya pertumbuhan yang terjadi pada suatu kultur mikroba.

#### IV. KESIMPULAN

1. Hasil seleksi mikroba dari tujuh mikroba terpilih yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan adalah BLCC B-3 dan BLCC B-5.
2. Pertumbuhan optimum mikroba BLCC B-3 dan BLCC B-5 yaitu pada umur inkubasi 14 jam.
3. Hasil seleksi nutrisi berdasarkan pengukuran pH, *Total Plate Count* (TPC), *Interfacial tension* (IFT), dan viskositas menunjukkan media BC-4 untuk BLCC B-3 dan media PA-4 untuk BLCC B-5 optimal mendukung aktivitas mikroba dalam memproduksi biosurfaktan.

#### KEPUSTAKAAN

1. **Anonim**, 2004. *Biochemical & Reagents for life Science Research*. Singapura: SIGMA.
2. **Ban, T., and Kato, T.** 1993, "Aqueous Microbial Biosurfactant Solution Exhibiting Ultralow Tension at Oil Water Interfaces", Di dalam: Premuzic E, Woohead A, editor. *Microbial Enhancement of Oil Recovery Recent Advances*. Proceeding of the International Conference on Microbial Enhanced Oil Recovery. J. Elsevier. Amsterdam.
3. **Cappucino, J. G., and Sherman.** 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. California.
4. **Chopinean et al.** 1988, "Production of Biosurfactant from Sugar Alcohol and Vegetable Oil Catalyzed by lipases in a Non Aqueous Medium", *Biotechnol. Bioeng.* 31:208-214.
5. **Cooper DG and Zajic JE.** 1980, "Surface-Active Compounds from Microorganisms", *Adv. Appl. Microbiol.* 26: 229-253.
6. **Desai, J. D., and Banat, I. M.** 1997, "Microbial Production of Surfactant by *Anthrobacter paraffineus* ATCC 19558", *J. Biotech. Bioeng.* 24:165-175.
7. **Fardiaz, S.** 1992, "Mikrobiologi Pangan I", PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
8. **Fox, S. L et al.,** 1993, "Comperative Analysis of Microbially Mediated Oil Recovery by Surfactant Produced by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*", 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.
9. **Jack TR.** 1993, " MORE to MEOR: an overview of Microbially Enhanced Oil Recovery in Microbial Enhancement of Oil Recovery Recent Advances", 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 Lake, L. W. 1989. "Enhanced Oil Recovery", New Jersey : Prentice Hall.
10. **Margaritis et al.,** 1979, "Production and Surface Active Properties of Microbial Surfactant", *Biotech. Bioeng.* 21: 1151-1162.
11. **Marshall KC.** 1980. *Reactions of Microorganism, Ion and Macromolecules at Interfaces*. *Contemporary Microbial Ecology*. London. Academic Press.
12. **Rachman, A.** 1989, "Pengantar Teknologi Fermentasi". Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
13. **Rosdyana, A.** 2004. *Optimasi Produksi Vinegar Dari Buah Nanas (Ananas comosus) Menggunakan Metoda Quick Process Dengan Melibatkan Ragi Saccharomyces cerevisiae dan Bakteri Acetobacter aceti*. Skripsi. Departemen Biologi. Institut Teknologi Bandung.
14. **Rosenberg E et al.,** 1979, "Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Specificity of Hydrocarbon Substrat", *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 409-413.
15. **Widiyanti, D.** 2002. *Pembuatan Keju dari Bahan Baku Keledai dengan Proses Fermentasi oleh Bakteri Lactobacillus bulgaricus (Luerssen & Kuhn) Holland dan Jamur Penicillium roqueforti Thom.* Skripsi. Departemen Biologi. Institut Teknologi Bandung.