



UNIVERSITAS INDONESIA

**BIODEGRADASI PYRENA MENGGUNAKAN
BACILLUS SUBTILIS C19**

SKRIPSI

**KHOTIB SARBINI
0806340113**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**BIODEGRADASI PYRENA MENGGUNAKAN
BACILLUS SUBTILIS C19**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik

**KHOTIB SARBINI
0806340113**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
DEPOK
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Khotib Sarbini

NPM : 0806340113

Tanda Tangan : 

Tanggal : 2 Juli 2012




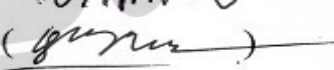
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Khotib Sarbini
NPM : 0806340113
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi :

Biodegradasi Pyrena Menggunakan *Bacillus subtilis* C19

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Heri Hermansyah, S.T., M.Eng. ()
Penguji I : Dr. Muhamad Sahlan, S.Si., M.Eng. ()
Penguji II : Prof. Dr.Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng. ()
Penguji III : Kamarza Mulia, PhD ()

Ditetapkan di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Tanggal : 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan nikmat, rahmat, serta karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

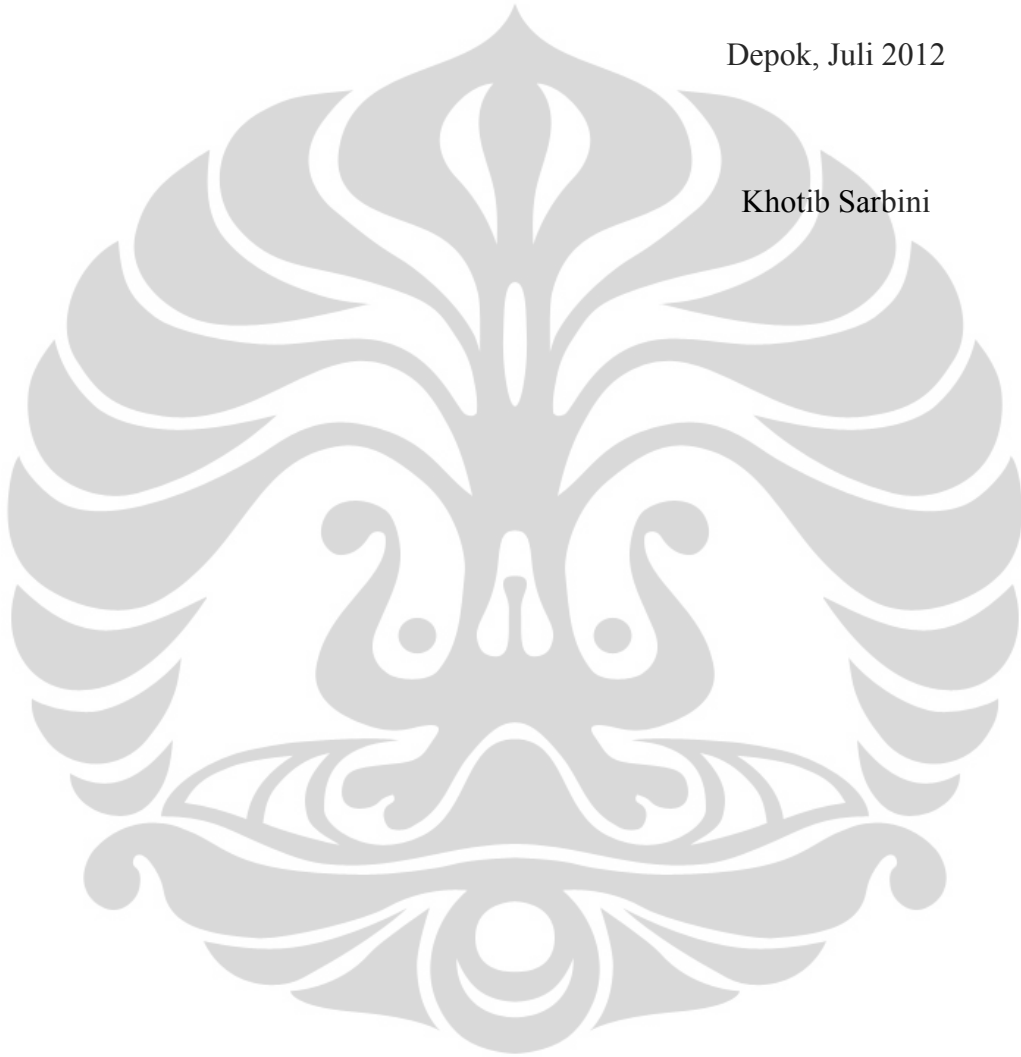
- (1) Dr. Heri Hermansyah S.T., M.Eng., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini;
- (2) Dr. Eng. Muhamad Sahlan S.Si., M.Eng., yang telah menyediakan waktu dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini;
- (3) Hanif Yuliani, S.Si., M.T., yang juga merupakan Mahasiswa S3 di Departemen Teknik Kimia FTUI atas bimbingan dan kerjasama dalam penyusunan makalah skripsi ini;
- (4) Ir. Rita Arbianti M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang telah menyediakan waktu dan membantu permasalahan akademik perkuliahan selama ini;
- (5) Para dosen Departemen Teknik Kimia FTUI yang telah memberikan ilmu dan wawasannya;
- (6) Keluarga tercinta yang selalu memberi dukungan dan semangat selama mengerjakan seminar ini;
- (7) Rekan satu bimbingan: Yongki Suharya Dipura atas kerja sama dan bantuan yang diberikan;
- (8) Teman-teman Laboratorium Bioproses rantai 4: Ota, Gesti, Prima, Ingrid, Cia, Laili, Hadi, Iyus, atas kerjasama dan bantuannya selama pengambilan data;
- (9) Teman-teman satu kontrakan: Radit, Ibong, Sungging, Aziz, Dimas, Riyandi, Nirwanto, yang telah memberikan bantuan dan semangat selama ini;

(10) Teman-teman Program Studi Teknologi Bioproses dan Teknik Kimia 2008
atas suasana akademis dan kemahasiswaan yang telah mendukung selama ini;

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala
kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat
bagi para pembaca dan bagi dunia pendidikan dan ilmu pengetahuan.

Depok, Juli 2012

Khotib Sarbini



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Khotib Sarbini

NPM : 0806340113

Program Studi : Teknologi Bioproses

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia ***Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)*** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Biodegradasi Pyrena Menggunakan *Bacillus subtilis* C19

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Pada tanggal : 2 Juli 2012

Yang menyatakan



(Khotib Sarbini)

ABSTRAK

Nama : Khotib Sarbini
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Biodegradasi Pyrena Menggunakan *Bacillus subtilis* C19

Biodegradasi pyrena sebagai salah satu senyawa PAHs (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) dilakukan dalam skala kecil dengan menggunakan bakteri *indigenous*, *Bacillus subtilis* C19, pada suhu inkubasi 27°C , pH 8.0 , dan 90 rpm. Penelitian dilakukan dengan variasi substrat 40, 200 dan 500 mg/L, dengan konsentrasi sel awal 1% (v/v) media kultur. Dari laju pertumbuhan spesifik (μ) pada masing-masing konsentrasi awal pyrena (S_0), diketahui kelarutan pyrena paling baik dalam media kultur adalah pada konsentrasi 200 mg/L, sedangkan pada konsentrasi pyrena yang lebih tinggi terjadi inhibisi oleh substrat yang menghambat pertumbuhan sel dan proses biodegradasinya. Karakteristik biosurfaktan yang diisolasi dari kultur bakteri dengan substrat pyrena (100 mg/L) diketahui jenis biosurfaktan yang dihasilkan adalah surfaktan kelompok lipopeptida. Uji efektivitas biosurfaktan dilakukan pada variasi pH dan kadar NaCl dengan substrat minyak kerosin, mendapatkan persentase emulsi terbaik masing-masing pada pH 7 (netral) dan tanpa penambahan NaCl (0 %).

Kata kunci:

Bacillus subtilis, biodegradasi, biosurfaktan, pyrena

ABSTRACT

Name : Khotib Sarbini
Study Program : Technolgy of Bioprocess
Title : Pyrene Biodegradation Using *Bacillus subtilis* C19

Biodegradation of pyrene as one of the PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) compounds is done on a small scale by using indigenous bacteria, *Bacillus subtilis* C19 in the incubation temperature 27°C, pH 8.0, and 90 rpm. The study was conducted with a variety of substrates 40, 200 and 500 mg/L, with the initial cell concentration of 1% (v / v) culture medium. The specific growth rate (μ) at each initial concentration pyrene (S), is known at best pyrena solubility in the culture medium is at a concentration of 200 mg/L, whereas at higher concentrations occur pyrene inhibition by the substrate that inhibits cell growth and its biodegradation processes. Characteristics of biosurfactant isolated from bacterial cultures with substrate pyrene (100 mg/L) known types of biosurfactant generated is surfaktin from lipopeptide group. Study the effectiveness of biosurfactant made on the variation of pH and NaCl content of the substrate kerosene oil, get the best percentage of each emulsion at pH 7 (neutral) and without the addition of NaCl (0%).

Keywords:

Bacillus subtilis, biodegradation, biosurfactant, pyrene

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB 1	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Batasan Penelitian	3
1.5 Sistematika Penulisan.....	3
BAB 2	5
TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Polycyclic Aromatic Hidrocarbons (PAHs).....	5
2.1.1 Sumber dan Macam PAHs.....	5
2.1.2 Pyrena	6
2.2 Biodegradasi.....	7
2.2.1 Proses Biodegradasi.....	7
2.2.2 Faktor-Faktor Pendukung Biodegradasi	9
2.2.3 Biodegradasi Pyrena	10
2.3 Mikroorganisme Pendegradasi Pyrena.....	15
2.3.1 Pertumbuhan Mikroorganisme.....	15
2.3.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri	17
2.3.3 Kinetika Pertumbuhan Bakteri - Substrat	20
2.3.4 Mikroorganisme dalam Biodegradasi Pyrena (<i>Bacillus subtilis</i>)....	25
2.3.5 Konsumsi Substrat oleh Bakteri.....	27

2.4	Biosurfaktan dalam Biodegradasi	28
2.4.1	Senyawa Aktif Permukaan (<i>surface active agent</i>).....	28
2.4.2	Pengaruh Penambahan Biosurfaktan pada Biodegradasi.....	30
2.4.3	Pelarutan Substrat oleh Biosurfaktan.....	31
2.4.4	Biosurfaktan Mikroorganisme	35
2.4.5	Produksi dan Isolasi Biosurfaktan	38
2.5	State of the Art (Pemetaan Biodegradasi Pyrena).....	38
BAB 3	40
METODOLOGI PENELITIAN	40
3.1	Rancangan Penelitian	40
3.2	Waktu dan Lokasi Penelitian.....	41
3.3	Bahan dan Alat Penelitian	42
3.3.1	Bahan Penelitian	42
3.3.2	Alat Penelitian.....	42
3.4	Variabel Penelitian	42
3.4.1	Variabel Bebas	42
3.4.2	Variabel Terikat	42
3.4.3	Variabel Kontrol	43
3.5	Pelaksanaan Penelitian	43
3.5.1	Pembuatan Kultur Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> C19	43
3.5.2	Proses Biodegradasi Pyrena.....	44
3.5.3	Produksi dan Isolasi Biosurfaktan	45
3.5.4	Uji Aktivitas Biosurfaktan	46
BAB 4	47
HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4.1	Kultur Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> C19	47
4.1.1	Peremajaan Bakteri	47
4.1.2	Prekultur Bakteri.....	47
4.1.3	Kultur Bakteri	48
4.2	Biodegradasi Pyrena.....	49
4.2.1	Pertumbuhan Bakteri dalam Kultur Biodegradasi	49
4.2.2	Perubahan Konsentrasi Pyrena dalam Kultur	52
4.2.3	Analisis Metabolit Biodegradasi.....	55
4.3	Biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> C19	57
4.3.1	Pertumbuhan Bakteri dalam Kultur Produksi Biosurfaktan	57

4.3.2	Produksi Biosurfaktan.....	57
4.3.3	Isolasi dan Karakterisasi Biosurfaktan.....	59
4.4	Uji Aktivitas Biosurfaktan	61
4.4.1	Pengukuran Indeks Emulsifikasi.....	61
4.4.2	Pengukuran Stabilitas Emulsi	63
BAB 5	67
KESIMPULAN DAN SARAN	67
5.1	Kesimpulan.....	67
5.5	Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN A	73
LAMPIRAN B	75
LAMPIRAN C	77



DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1. Sifat Fisika dan Kimia PAHs.....	1
Tabel 2. 1 Senyawa-senyawa PAHs	6
Tabel 2. 2 Sifat fisika dan kimia pyrena	7
Tabel 2. 3 Penentuan variasi konsentrasi substrat pyrena dalam proses biodegradasi	14
Tabel 2. 4 Klasifikasi bakteri berdasarkan temperatur	18
Tabel 2. 5 Model-model kinetik biodegradasi	20
Tabel 2. 6 Kinetik inhibisi enzimatik substrat	25
Tabel 2. 7 Klasifikasi biosurfaktan dari beberapa mikroorganisme	37
Tabel 2. 8 Pemetaan Penelitian Kinetika Biodegradasi Pyrena	39
Tabel 3. 1 Rencana waktu penelitian biodegradasi pyrena.....	41
Tabel 4. 1 OD bakteri kultur biodegradasi pada fase eksponensial.....	50
Tabel 4. 2 Data konsentrasi pyrena dari kultur biodegradasi.....	52
Tabel 4. 3 Report MS dari kromatogram GC.....	56
Tabel 4. 4 Persentase metabolit biodegradasi pyrena oleh <i>B. subtilis</i> C19.....	56
Tabel 4. 5 Aktivitas emulsifikasi (E_{24}) biosurfaktan, surfaktan Tween 80 dan <i>blanko</i> 1 % <i>yeast extract</i>	59
Tabel 4. 6 Emulsifikasi <i>crude biosurfactant</i> (0.2%, w/v) pada variasi pH.....	63
Tabel 4. 7 Emulsifikasi <i>crude biosurfactant</i> (0.2%, w/v) pada variasi NaCl (0-20%. w/v).....	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur pyrena, C ₁₆ H ₁₀	7
Gambar 2. 2 Mekanisme degradasi pyrena.....	11
Gambar 2. 3 Senyawa intermediet dari degradasi dengan aktivitas MnP dari <i>Bjerkandera</i> sp. BOS55	12
Gambar 2. 4 Jalur degradasi pyrena.....	13
Gambar 2. 5 Kurva pertumbuhan bakteri	16
Gambar 2. 6 Kinetika Haldane.....	22
Gambar 2. 7 Kinetika mikroba sederhana.....	22
Gambar 2. 8. Skema reaksi enzimatik dengan satu substrat.....	23
Gambar 2. 9. Laju reaksi-konsentrasi substrat untuk reaksi kinetika Michaelis-Menten	23
Gambar 2. 10. Grafik Lineweaver-Burk.....	24
Gambar 2. 11. Tahap dasar reaksi berkatalis enzim	24
Gambar 2. 12. Inhibisi kompetitif substrat	25
Gambar 2. 13. Inhibisi kompetitif produk	25
Gambar 2. 14 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	26
Gambar 2. 15 Konsumsi substrat oleh bakteri dalam proses biodegradasi.....	27
Gambar 2. 16 Pembentukan misel dalam air dan solubilisasi.....	29
Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian biodegradasi pyrena	40
Gambar 4. 1 Peremajaan bakteri <i>Bacillus subtilis</i> C19.....	47
Gambar 4. 2 Prekultur bakteri <i>Bacillus subtilis</i> C19	48
Gambar 4. 3 Kultur bakteri. (a) biodegradasi, (b) produksi biosurfaktan.....	49
Gambar 4. 4 Kurva pertumbuhan <i>B. subtilis</i> C19 kultur biodegradasi.....	49

Gambar 4. 5 Laju pertumbuhan spesifik pada beberapa konsentrasi pyrena.....	51
Gambar 4. 6 Kurva standar pyrena pada <i>n</i> -heksana.....	52
Gambar 4. 7 Profil biodegradasi pyrene oleh <i>Bacillus subtilis</i> C19	53
Gambar 4. 8 Kromatogram GC metabolit biodegradasi pyrena oleh <i>Bacillus subtilis</i> C19	55
Gambar 4. 9 Kurva pertumbuhan bakteri <i>B. subtilis</i> C19 pada kultur produksi biosurfaktan.....	57
Gambar 4. 10 Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur pada hari ke 12 inkubasi (variasi minyak nabati)	58
Gambar 4. 11 Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur pada hari ke 12 inkubasi (variasi minyak pelumas/oli).....	58
Gambar 4. 12 Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur pada hari ke 12 inkubasi (variasi minyak kerosene)	59
Gambar 4. 13 <i>Crude biosurfactant Bacillus subtilis</i> C19	60
Gambar 4. 14 Spektrum FTIR standar surfaktin (Sigma Chemicals).....	60
Gambar 4. 15 Spectrum FTIR biosurfaktan <i>Bacillus subtilis</i> C19	61
Gambar 4. 16 Emulsifikasi biosurfaktan pada minyak nabati (Bimoli) dan pelumas (Castrol Oil).....	62
Gambar 4. 17 Indeks emulsifikasi biosurfaktan pada minyak nabati dan pelumas	62
Gambar 4. 18 Emulsifikasi <i>crude biosurfactant</i> (0.2%, w/v) pada variasi pH....	64
Gambar 4. 19 Emulsifikasi <i>crude biosurfactant</i> (0.2%, w/v) pada variasi pH....	64
Gambar 4. 20 Emulsifikasi <i>crude biosurfactant</i> (0.2%, w/v) pada variasi NaCl (0-20%. w/v).....	65
Gambar 4. 21 Emulsifikasi <i>crude biosurfactant</i> (0.2%, w/v) pada variasi NaCl (0-20%. w/v).....	66

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Minyak bumi sebagai sumber energi tak terbarukan tetap menjadi sumber utama pemenuhan kebutuhan energi, khususnya di Indonesia. Selain sebagai sumber energi, penggunaan turunan minyak mentah ini sebagai bahan-bahan sintesis menyebabkan meningkatnya kegiatan eksplorasi dan produksi minyak bumi pada industri pengilangan minyak bumi. Kegiatan proses ini memungkinkan industri menghasilkan produk samping limbah berupa lumpur minyak bumi (*oil sludge*) yang sangat beresiko terhadap lingkungan.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) merupakan salah satu bahan pencemar berbahaya yang berasal dari limbah lumpur minyak bumi. PAHs diproduksi melalui pembakaran tidak sempurna bahan bakar fosil, pembakaran sampah dan proses industri serta terjadi secara alami pada hutan, dan lain-lain (Cerniglia et al., 2006). Pyrena, PAH yang terdiri dari empat cincin benzena yang digabungkan, biasa ditemukan sebagai polutan pada udara, air dan tanah. Mayoritas PAH bersifat karsinogenik dan berbahaya bagi kesehatan serta dapat meningkatkan resiko kanker kulit dan kerusakan paru-paru.

Tabel 1. 1. Sifat Fisika dan Kimia PAHs

PAH	Cincin	Titik leleh (°C)	Titik didih (°C)	Kelarutan dalam cair (mg/L)
Phenanthrene	3	101	340	1.29
Anthracene	3	216	340	0.07
Fluoranthene	4	111	250	0.26
Benz[<i>a</i>]anthracene	4	158	400	0.014
Pyrene	4	149	360	0.14
Chrysene	4	255	488	0.002
Benz[<i>a</i>]pyrene	5	179	496	0.0038
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	5	262	524	0.0005

(Sumber: Juhasz dan Naidu, 2000)

Studi degradasi mikroba menunjukkan sulitnya untuk mendegradasi PAHs dengan berat molekul tinggi dengan empat atau lebih cincin aromatik daripada PAHs dengan berat molekul lebih rendah. Hal ini dikarenakan PAHs dengan berat molekul tinggi lebih stabil dan hidrofobik dan terserap pada partikel solid (Talley et al., 2002). Pyrena termasuk dalam PAHs dengan berat molekul tinggi dan secara struktur sama dengan beberapa PAHs yang bersifat karsinogenik.

Bioremediasi menjadi salah satu pilihan dalam menangani permasalahan pencemaran senyawa PAHs, khususnya pyrena. Dengan memanfaatkan sifat *indigenous* ataupun *extraneous* mikrobial seperti *Bacillus subtilis* atau *consortium bacteria* lainnya, bioremediasi mampu mengatasi pencemaran hidrokarbon sekaligus ramah lingkungan dan mampu mereduksi komponen pencemar yang berbahaya (Liu et al., 2011). Penanganan bioremediasi secara biologis dilakukan dengan penambahan biosurfaktan yang diisolasi dari mikroba tersebut. Penambahan ini bertujuan untuk meningkatkan kelarutan dari substrat yang tidak larut dalam air dan membentuk misel, sehingga mikroorganisme dapat dengan mudah mendegradasinya.

Dari hasil seleksi, *Bacillus subtilis* C19 berpotensi untuk diaplikasikan dalam biodegradasi senyawa PAHs khususnya pyrena. Hal tersebut disebabkan, bakteri tersebut mampu menghasilkan biosurfaktan dan melakukan biodegradasi pyrena dengan baik (Yuliani, 2011). Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui kinerja bakteri *B. subtilis* C19 dalam mendegradasi pyrena dan melakukan isolasi dan karakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan dari kultur bakteri dengan substrat pyrena sebagai sumber karbon dan melakukan beberapa uji untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan tersebut sebagai bioemulsifier.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana profil biodegradasi pyrena dilihat dari pertumbuhan biomassa (X) dan profil konsentrasi pyrena dalam kultur selama inkubasi 28 hari, serta biosurfaktan jenis apa yang dihasilkan oleh *B. subtilis* C19 dengan substrat pyrena sebagai sumber karbon dan aktivitasnya terhadap variasi pH dan kadar garam.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui profil biodegradasi pyrena dilihat dari pertumbuhan biomassa (X) dan profil konsentrasi kultur selama inkubasi 28 hari, serta jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh *B.subtilis* C19 dengan substrat pyrena sebagai sumber karbon dan aktivitasnya terhadap variasi pH dan kadar garam. Dilakukan juga analisis metabolit yang dihasilkan *strain B. subtilis* C19 pada proses biodegradasi tersebut.

1.4 Batasan Penelitian

Batasan-batasan penelitian antara lain:

1. Bakteri pendegradasi yang digunakan adalah *B. subtilis* C19.
2. Metabolit (biosurfaktan) yang dianalisis diisolasi dari *B. subtilis* C19.
3. Biosurfaktan yang dihasilkan adalah dalam bentuk *crude biosurfactant*.
4. Analisis kandungan pyrena selama biodegradasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan pyrena terbaik (kurva standar).

1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan yang digunakan dalam makalah seminar ini adalah:

BAB 1 PENDAHULUAN

Bab ini menjelaskan tentang latar belakang, perumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menjelaskan tentang *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAHs) khususnya pyrena, proses dalam biodegradasi pyrena, mikroorganisme pendegradasi, biosurfaktan dari beberapa mikroorganisme, serta kinetika sederhana untuk mengestimasi pengaruh laju pertumbuhan sel terhadap konsumsi substrat.

BAB 3 METODA PENELITIAN

Bab ini menjelaskan tahapan penelitian yang akan dilakukan, diagram alir prosedur penelitian, tahapan pembuatan kultur biodegradasi, proses biodegradasi pyrena, tahapan analisis konsentrasi pyrena selama

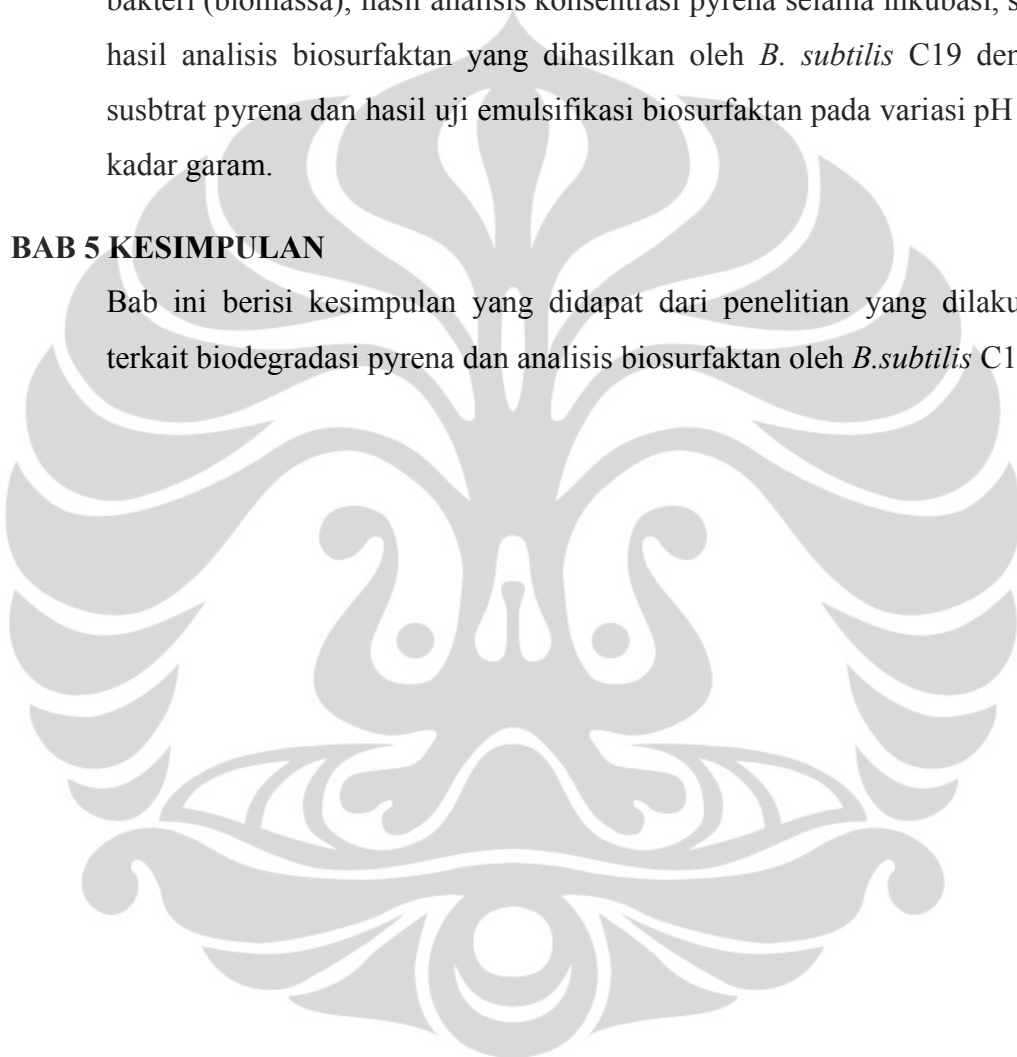
biodegradasi, serta produksi, isolasi dan karakterisasi biosurfaktan *B.subtilis* C19, juga uji emulsifikasi biosurfaktan pada variasi pH dan kadar garam.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini menjelaskan hasil kultur biodegradasi, kinetika pertumbuhan sel bakteri (biomassa), hasil analisis konsentrasi pyrena selama inkubasi, serta hasil analisis biosurfaktan yang dihasilkan oleh *B. subtilis* C19 dengan susbtat pyrena dan hasil uji emulsifikasi biosurfaktan pada variasi pH dan kadar garam.

BAB 5 KESIMPULAN

Bab ini berisi kesimpulan yang didapat dari penelitian yang dilakukan terkait biodegradasi pyrena dan analisis biosurfaktan oleh *B.subtilis* C19.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Polycyclic Aromatic Hidrocarbons (PAHs)

2.1.1 Sumber dan Macam PAHs

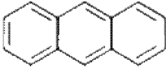
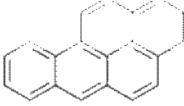
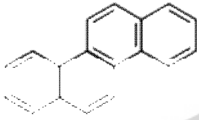
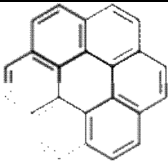
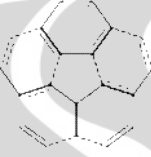
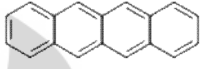

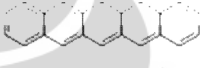
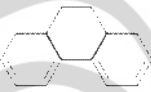
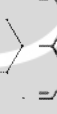

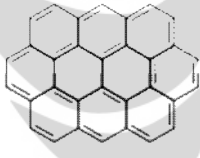
PAHs (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) merupakan senyawa polutan yang terdiri dari gabungan cincin-cincin aromatik. PAHs dapat ditemukan pada minyak, batu bara, dan diproduksi sebagai produk antara dari pembakaran bahan bakar baik bahan bakar fosil maupun biomassa. Sebagai senyawa polutan, PAHs mendapat perhatian karena beberapa senyawanya diidentifikasi bersifat karsinogenik, mutagenik, dan teratogenik.

Senyawa PAHs banyak terdapat pada asap kendaraan bermotor, asap pabrik, asap rokok, asap pembakaran arang, asap hasil kebakaran hutan, asap minyak goreng, aspal petroleum, beberapa pelarut komersial, bahan pengawet kayu dan juga hasil pirolisis karbohidrat, asam amino, serta asam lemak. (Elisabeth et al., 2000). PAHs yang terdapat pada makanan terjadi akibat adanya proses pengolahan yang menggunakan suhu tinggi seperti pemanggangan maupun akibat adanya kontaminasi dari udara.

PAHs bersifat lipofilik, bercampur lebih mudah dengan minyak daripada air. Kebanyakan senyawanya sedikit terlarut dalam air dan sedikit *volatile*. Karena sifatnya tersebut, PAHs di lingkungan pada umumnya ditemukan di tanah, endapan dan substansi berminyak. PAHs merupakan salah satu polutan organik yang tersebar luas. Selain itu, kehadirannya di dalam bahan bakar fosil juga dibentuk melalui pembakaran tidak sempurna. Tingkat toksisitas PAHs sangat bergantung dengan struktur pembentuknya (isomer).

Deteksi PAHs biasanya dilakukan dengan menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography–Mass Spectroscopy*), atau kromatografi cair dengan sinar tampak (ultraviolet) atau metode spektroskopik floresens serta metode cepat dengan PAH indikator. Umumnya dilakukan analisis dengan ekstraksi, purifikasi untuk mengetahui kandungan PAHs pada sampel yang diuji.

Tabel 2. 1 Senyawa-senyawa PAHs

Senyawa	Struktur	Senyawa	Struktur
Anthracene		Benzo[a]pyrene	
Chrysene		Coronene	
Corannulene		Tetracene	
Naphtalene		Pentacene	
Phenanthrene		Pyrene	
Triphenylene		Ovalene	

(Sumber: *United States Environmental Protection Agency*, en.wikipedia.org)

Banyak senyawa-senyawa aromatik, termasuk PAHs, yang bersifat karsinogenik. Hal ini didasarkan sifatnya yang hidrofobik dan tidak memiliki gugus metil atau gugus reaktif lainnya untuk dapat diubah menjadi senyawa yang lebih polar. Akibatnya senyawa PAHs sangat sulit diekskresi dari dalam tubuh dan biasanya terakumulasi pada jaringan hati, ginjal maupun adiposa atau lemak tubuh. Struktur molekul yang menyerupai basa nukleat menyebabkan mudahnya PAHs tersisipkan pada untaian DNA dan mengganggu fungsi DNA tersebut (Elisabeth et al., 2000)

2.1.2 Pyrena

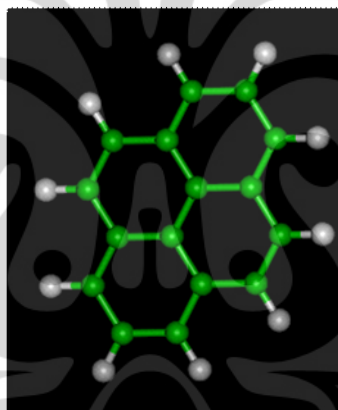
Pyrena yang merupakan salah satu PAHs dengan berat molekul tinggi bersifat stabil dan hidrofobik, sehingga diperlukan penambahan surfaktan untuk meningkatkan kelarutan substrat sehingga larut dalam air dan membentuk misel. Dengan demikian, mikroorganisme dapat dengan mudah mendegradasinya.

Senyawa pyrena bersifat karsinogenik dan pemanfaatannya banyak digunakan untuk membuat pewarna, plastik dan pestisida.

Sebagai salah satu dari senyawa PAHs, pyrena bersifat karsinogenik, mudah terpapar ketika bernapas dengan udara yang terkontaminasi atau ketika melakukan kontak dengan tanah yang terkontaminasi senyawa PAHs. Di dalam tubuh, pyrena dapat menyebar pada jaringan tubuh serta mengganggu fungsi ginjal.

Tabel 2. 2 Sifat fisika dan kimia pyrena

Tampilan	Padat
Titik didih	360 °C
Titik lebur	149 °C
Specific gravity	1,271



Gambar 2. 1 Struktur pyrena, $C_{16}H_{10}$
(Sumber: <http://www.nyu.edu>)

2.2 Biodegradasi

2.2.1 Proses Biodegradasi

Biodegradasi merupakan proses alami oleh mikroorganisme yang menggunakan hidrokarbon sebagai sumber makann dan menghasilkan karbondioksida, air, biomassa, dan senyawa oksidasi lain dari hasil metabolismenya. Proses biodegradasi merupakan salah satu oksidasi dasar, dimana enzim bakteri mengkatalisis penempatan oksigen ke dalam hidrokarbon, sehingga molekul dapat digunakan dalam metabolisme seluler. Beberapa molekul didegradasi secara lengkap menjadi CO_2 dan H_2O , sedangkan yang lain diubah dan digabungkan menjadi biomassa. Parafinik atau fraksi alifatik merupakan

fraksi yang paling mudah didegradasi oleh mikroba, sedangkan fraksi naftenik dan aromatik dengan berat molekul lebih tinggi lebih sulit didegradasi.

Keberhasilan proses biodegradasi banyak ditentukan oleh aktivitas enzim. Untuk itu perlu dicari mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim pendegradasi hidrokarbon, kemudian aktivitasnya dioptimalkan dengan pengaturan kondisi dan penambahan suplemen yang sesuai. Disamping faktor lingkungan, pertumbuhan mikroorganisme banyak ditentukan oleh nutrisi yang tersedia. Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya. Dalam kaitan ini sumber C telah tersedia dari hidrokarbonnya sendiri. Senyawa lain yang menjadi faktor pembatas, yaitu N dan P. Kadar kedua unsur ini banyak menentukan aktivitas mikroorganisme, terutama dalam pertumbuhan dan biosintesis unsur pokok bakterial. Nitrogen merupakan unsur pokok protein dan asam nukleat, yaitu unsur makro yang berperan dalam pertumbuhan, perbanyakan sel, dan pembentukan dinding sel. Fosfor merupakan komponen utama asam nukleat dan lemak membran sel yang berperan dalam proses pemindahan energi secara biologi. Fosfor berguna untuk pembentukan asam amino, transpor energi dan pembentukan senyawa antara dalam reaksi metabolisme (Leahy dan Colwell, 1990). Beberapa hal yang telah diketahui mengenai biodegradasi senyawa hidrokarbon menurut Cookson adalah sebagai berikut:

- a) Biodegradasi adalah proses aerobik, membutuhkan kelembaban di atas 50% dan pH di bawah 8,5.
- b) Senyawa hidrokarbon rantai pendek dan aromatik ringan akan menguap dan umumnya didegradasi oleh bakteri dalam kondisi terlarut.
- c) Alkana rantai panjang lebih mudah didegradasi daripada alkana rantai pendek. Untuk mendegradasi alkana rantai pendek dibutuhkan kometabolisme.
- d) Alifatik jenuh lebih mudah didegradasi daripada alifatik tidak jenuh. Alifatik rantai bercabang lebih sulit didegradasi daripada alifatik rantai lurus.
- e) Tingkat kesulitan biodegradasi senyawa hidrokarbon alisiklik dan aromatik sangat bergantung pada tipe substitusi, kompleksitas strukturnya,

dan untuk senyawa aromatik juga ditentukan oleh jumlah cincin dan atom heterosiklik. Peningkatan kejenuhan pada senyawa aromatik mengurangi tingkat degradasi.

- f) Senyawa aromatik dengan 2 atau 3 cincin jauh lebih mudah didegradasi oleh bakteri dibandingkan dengan senyawa aromatik dengan cincin yang lebih banyak.
- g) Jika diurutkan dari senyawa yang mudah didegradasi sampai yang tersulit didegradasi secara individu senyawa maka urutan tersebut adalah:
 1. *n*-alkana rantai panjang
 2. alkana bercabang
 3. senyawa aromatik dengan berat molekul rendah
 4. alisiklik
 5. aromatik dengan berat molekul tinggi
 6. senyawa polar (aspal dan resin)

2.2.2 Faktor-Faktor Pendukung Biodegradasi

Keberhasilan proses biodegradasi banyak ditentukan oleh aktivitas enzim. Untuk itu perlu dicari mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim pendegradasi hidrokarbon, kemudian aktivitasnya dioptimalkan dengan pengaturan kondisi dan penambahan suplemen yang sesuai. Selain menghasilkan enzim, beberapa mikroorganisme juga berpotensi dalam menghasilkan bioemulsifier atau biosurfaktan sebagai produk metabolit sekunder dalam fase pertumbuhannya. Biosurfaktan ini berfungsi dalam meningkatkan kelarutan substrat (senyawa hidrokarbon) dalam fase cair untuk lebih mudah dikonsumsi oleh mikroorganisme tersebut.

Ditemukannya mikroorganisme yang bersifat *degradable* terhadap buangan minyak bumi, perlu ditingkatkan aktivitasnya agar dapat berperan aktif dalam mendegradasi limbah minyak tersebut. Dalam hal ini perlu diperhatikan faktor-faktor pendukung kegiatan tersebut, yaitu antara lain kandungan air, pH dan suhu, nutrisi yang tersedia, penambahan surfaktan dan ada atau tidak adanya material toksik (Udiharto, 1996).

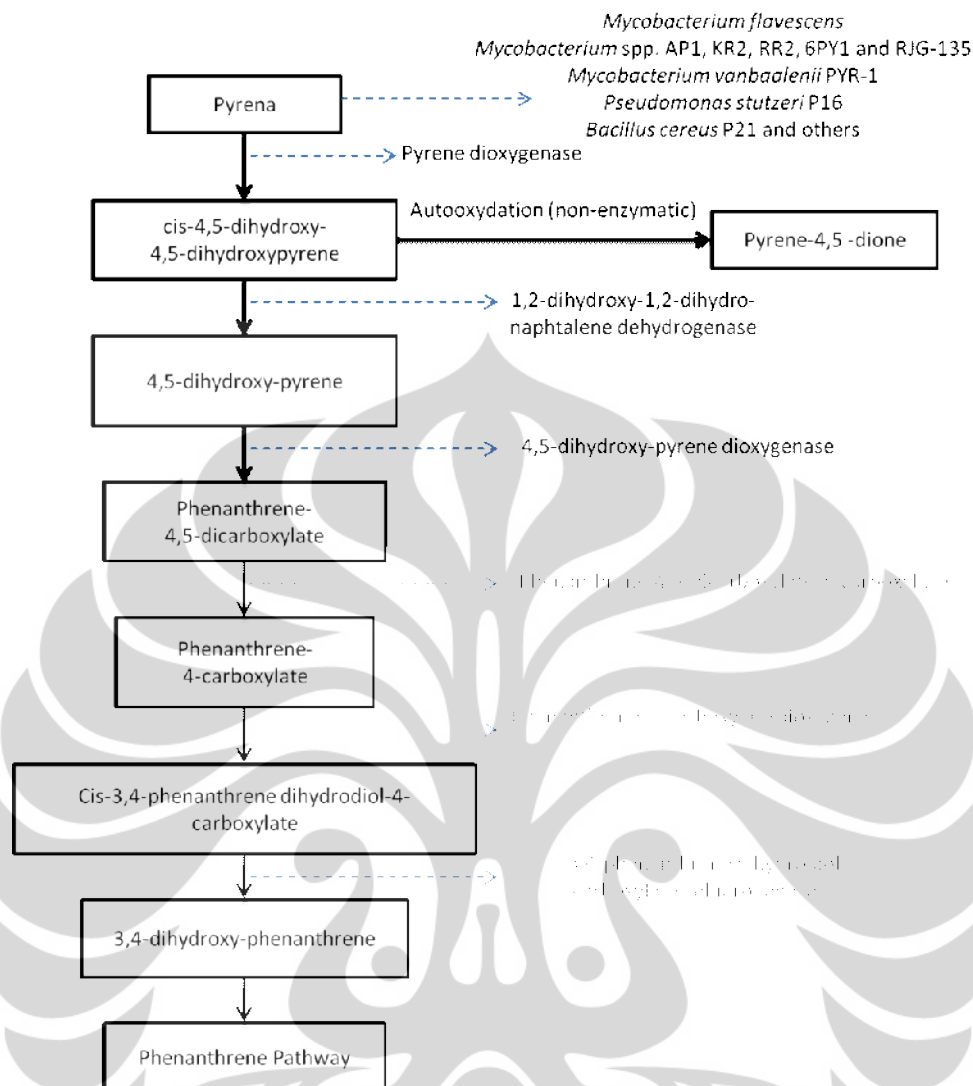
Kandungan air sangat penting untuk hidup, tumbuh, dan aktivitas metabolik dari mikroorganisme. Tanpa air, mikroorganisme tidak dapat hidup

dalam limbah minyak. Mikroba akan hidup aktif pada interfase antara minyak dengan air. Selain itu, meskipun biodegradasi hidrokarbon minyak bumi dapat berlangsung dalam kondisi anaerobik, bagaimanapun kondisi biodegradasi aerobik lebih efektif, sehingga suplai oksigen yang cukup merupakan faktor penting dalam kesuksesan terjadinya biodegradasi.

Disamping faktor lingkungan, pertumbuhan mikroorganisme banyak ditentukan oleh nutrien yang tersedia. Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya. Dalam kaitan ini sumber C telah tersedia dari hidrokarbonnya sendiri. Senyawa lain yang menjadi faktor pembatas, yaitu N dan P. Kadar kedua unsur ini banyak menentukan aktivitas pertumbuhan mikroorganisme. Selain unsur-unsur diatas juga diperlukan adanya mineral dan unsur lain yang sesuai dan memadai (Udiharto, 1992).

2.2.3 Biodegradasi Pyrena

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, pyrena merupakan senyawa hidrokarbon aromatik dengan empat cincin. Dalam penggolongan tingkat kesulitan senyawa hidrokarbon pada proses biodegradasi, pyrena merupakan golongan hidrokarbon yang sulit didegradasi karena berat molekulnya yang tinggi. Proses biodegradasi pyrena dilakukan dengan cara pemutusan salah satu ikatan karbon aromatik pyrena membentuk rantai aromatik tiga cincin, yakni *phenanthrene*. Berikut tahapan-tahapan degradasi pyrena:

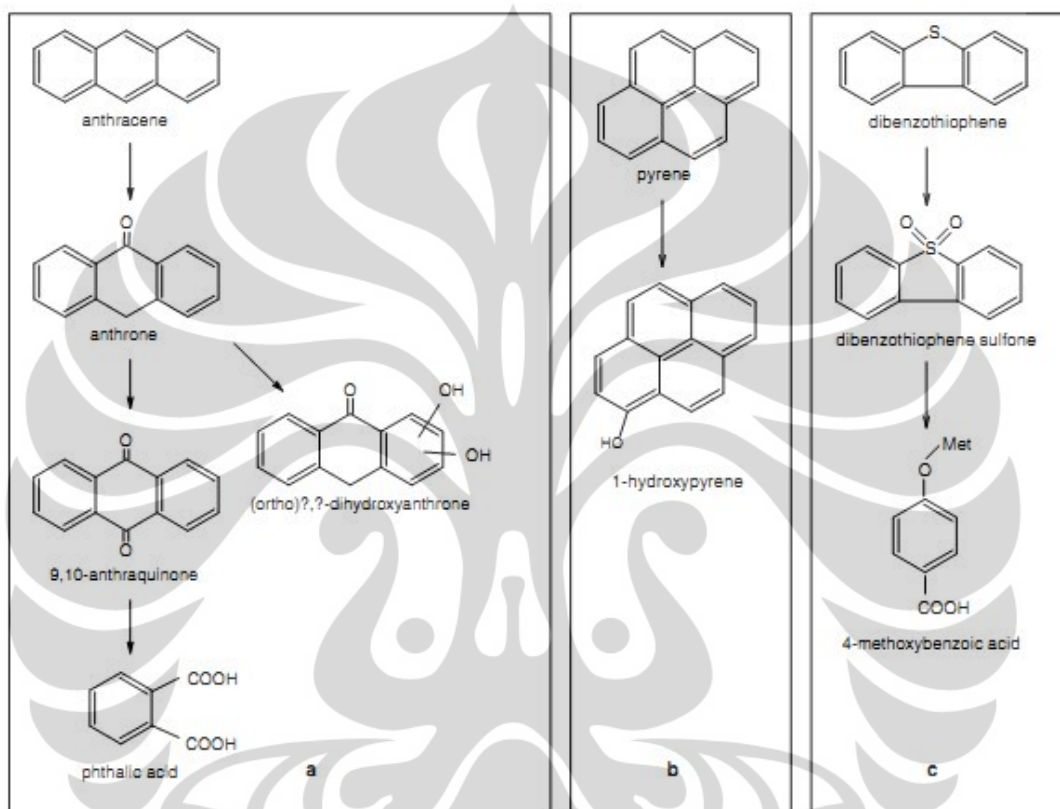


Gambar 2. 2 Mekanisme degradasi pyrena
(Sumber: Keith, 2011)

Seperti lazimnya proses biodegradasi oleh mikroorganisme, biodegradasi pyrena oleh beberapa mikroorganisme di atas (*Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) juga melibatkan enzim; *dioxygenase*, *dihydrogenase* dalam pemutusan rantai oksigen dan hidrogen. Akan tetapi, selain enzim tersebut juga dihasilkan bioemulsifier yang meningkatkan kelarutan pyrena dalam medium, sehingga memudahkan konsumsi oleh mikroorganisme dan meningkatkan efektivitas biodegradasinya.

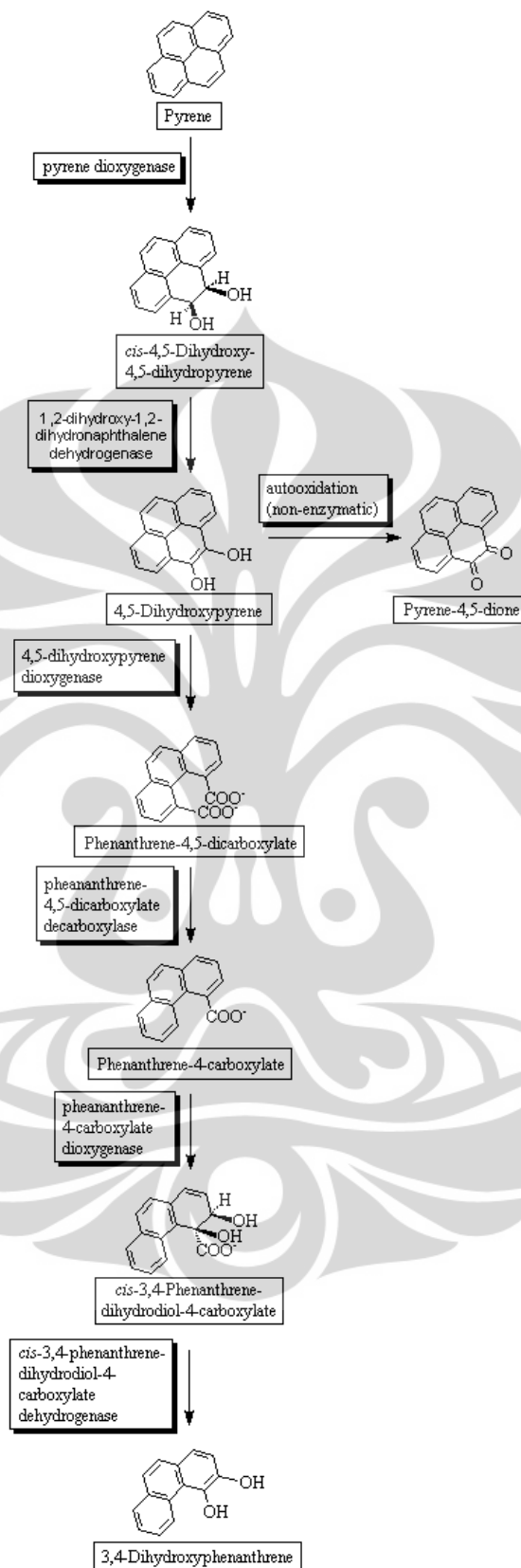
Eibes et al., (2006) melihat degradasi enzimatik tiga senyawa PAHs, antrasena, dibenzotiofena dan pyrena oleh enzim lignolitik, manganase peroksidase (MnP) dari jamur basidiomikota, *Bjerkandera* sp. BOS55, pada media dengan pelarut organik, aseton (36%, v/v). Kinerja katalitik peroksidase

membentuk metabolit hasil degradasi yang lebih polar dan larut dalam air. Aktivitas oksidatif manganase peroksidase (MnP) melewati produksi ion manganase, yang merupakan oksidan yang terdifusi secara bebas. Performa degradasi enzim ekstraseluler dibatasi oleh potensial ionisasi (IP) senyawa senobiotik, yang berhubungan dengan mudahnya pelepasan π -elektron dari molekul-molekul aromatik.



Gambar 2.3 Senyawa intermediet dari degradasi (a) antrasena, (b) pyrena, dan (c) dibenzotiofena dengan aktivitas MnP dari *Bjerkandera* sp. BOS55 (Sumber: Eibes et al., 2006)

Verdin et al., (2004) juga melihat pengaruh enzim oksidatif ekstraseluler, yakni lakase, lignin peroksidase (LiP) dan manganase peroksidase (MnP) dalam degradasi benzo[a]pyrena oleh jamur basidiomikota, *Trichoderma viride*, *Fusarium solani* dan *Fusarium oxysporum*. Hasilnya, aktivitas ligninase *Trichoderma viride* memiliki aktivitas oksidatif terbaik, yang membantu degradasi benzo[a]pyrena lebih efektif. Sebaliknya tidak ada pengaruh yang signifikan dari aktivitas lakase dari ketiga strain terhadap degradasi benzo[a]pyrena.



Gambar 2. 4 Jalur degradasi pyrena
(Sumber: Keith, 2011)

Berikut diberikan pemetaan dalam menentukan variasi konsentrasi pyrena yang digunakan sebagai susbtrat dalam penelitian ini:

Tabel 2. 3 Penentuan variasi konsentrasi substrat pyrena dalam proses biodegradasi

Mikroba	Konsentrasi Awal Substrat	% Degradasi (hari)	Referensi
<i>Proteus vulgaris</i>	0.5 mg/mL pyrene	71.5 % , (7 hari)	Ceyhan, 2011
<i>Bacillus subtilis</i> <i>P. aeruginosa</i>	250 mg/100 mL pyrene	ST 30 mN/m ST 45 mN/m	Das and Mukherjee, 2006
<i>Paracoccus Aminovorans</i>	40 mg/L chrysene	85.2 % , (8 hari)	Yu-bin et al., 2011
<i>Candida viswanathii</i>	100 mg/200 mL PAHs	89.7% naphthalene 77.21 % phenanthrene 60.77 % pyrene	El-Latief Hesham, 2009
<i>Spingomonas sp.</i>	100 mg/L	100-85 mg/L, (7 hari)	Supaka et al., 2000
<i>Mycobcaterium</i> <i>Spingomonas</i> <i>Terrabacter</i> <i>Sphingopyxis</i> <i>Spinngobium</i> <i>Rhodococcus</i>	100 mg/L	Identifikasi gen	Zhou et al., 2006
<i>Ochrobactrum sp</i>	50 mg/L	20 %BaP, (80 hari)	Yirui et al., 2008
<i>Pseudomonas putida</i>	200 mg/L	68 ± 2 % pyrena, (5 hari)	Kumar et al., 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	50 mg/L	84.66 % , (28 hari)	Lily et al., 2009

Dari beberapa referensi di atas, maka ditentukan variasi konsentrasi awal pyrena untuk proses biodegradasi, yakni pada 40, 200, dan 500 mg/L. Diharapkan pada konsentrasi tersebut, dapat diketahui kinetika pertumbuhan bakteri terhadap variasi konsentrasi substrat mulai dari konsentrasi susbtrat yang rendah hingga pada konsentrasi yang tinggi.

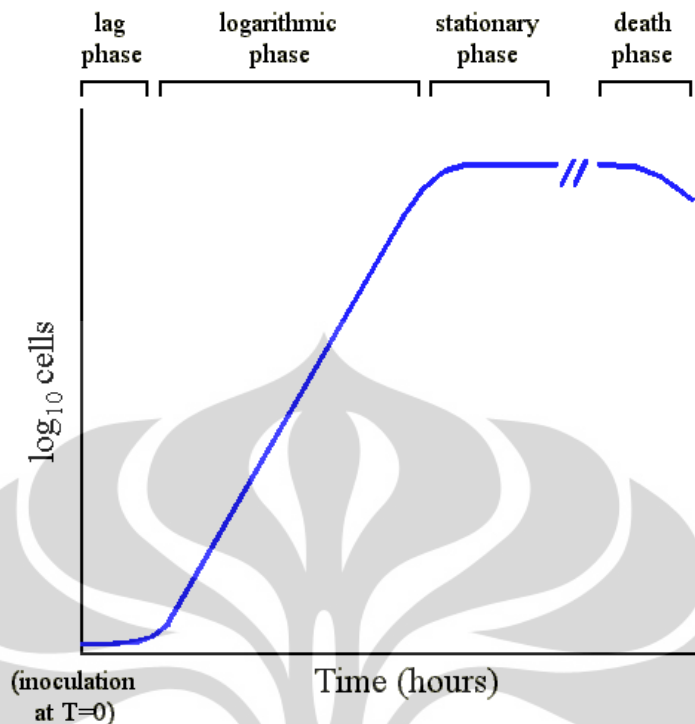
2.3 Mikroorganisme Pendegradasi Pyrena

2.3.1 Pertumbuhan Mikroorganisme

Mikroorganisme merupakan subjek dalam biodegradasi sehingga proses biodegradasi sangat dipengaruhi oleh aktivitas mikroorganisme tersebut. Degradasi material organik di lingkungan umumnya dilakukan oleh dua kelompok primer mikroorganisme, yaitu bakteri dan fungi. Bakteri merupakan organisme prokariotik (tidak mempunyai sel membran) yang dapat ditemukan di seluruh ekosistem lingkungan hidup. Bakteri memiliki morfologi yang sederhana dengan ukuran 1 – 10 μm . Bakteri tidak memiliki membran sel seperti halnya organisme eukariotik fungi, protozoa, alga, tumbuhan dan hewan, namun biokimia secara umum memiliki pertumbuhan dan metabolisme yang cepat dan mampu beradaptasi secara cepat terhadap berbagai kondisi lingkungan. Karakteristik yang membuatnya sangat berguna dalam proses biodegradasi (Kuswardini, 2004).

Pada kondisi yang memungkinkan, yaitu dengan adanya karbon, sumber energi dan nutrien yang cukup, bakteri dapat meningkatkan jumlahnya dengan cara membelah diri. Pada proses ini, satu sel bakteri dapat membelah menjadi dua sel. Dua sel tersebut kemudian membelah lagi menjadi empat dan seterusnya. Waktu yang dibutuhkan bakteri untuk membelah diri menjadi dua disebut waktu generasi (*genetation time*). Bakteri memiliki waktu generasi yang singkat, umumnya dalam hitungan menit, jam, hari ataupun minggu. Oleh karena jumlah populasi bakteri berganda dalam setiap generasinya, maka jumlah bakteri dapat meningkat dalam laju yang cepat.

Tipe pertumbuhan bakteri tidak berlangsung dalam periode waktu yang kontinyu, namun dipengaruhi oleh lingkungan dan nutrisi yang terkandung didalamnya. Nutrisi ini sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Kurang nutrisi dapat menyebabkan berhentinya pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri dapat digambarkan dalam kurva pertumbuhan seperti pada gambar.



Gambar 2. 5 Kurva pertumbuhan bakteri
(Sumber: Blaber, M. 1998)

Kurva pertumbuhan ini dapat dibagi ke dalam empat fase pertumbuhan, yaitu:

5.1 Fase Penyesuaian (*lag phase*)

Fase ini mencakup interval waktu antara tahap penanaman dan saat tercapainya kecepatan pembelahan maksimum. Pada fase ini bakteri melakukan sintesa molekul-molekul yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan pembelahan sel serta enzim metabolisme yang diperlukan. Selain itu juga bakteri mengalami penambahan ukuran sel. Lamanya fase ini bergantung pada kondisi pertumbuhan bakteri.

5.2 Fase Pertumbuhan Eksponensial (*logarithmic phase*)

Pada fase ini, sel bakteri mengalami proses pembelahan diri dengan laju yang sesuai dengan kemampuannya dalam menyerap nutrisi dari lingkungan. Populasi bakteri bertambah dengan laju pertumbuhan maksimum dan berlipat ganda sebagai fungsi dari waktu generasinya. Karena kecepatan pembelahan diri relatif konstan, maka tahap ini paling cocok untuk menetapkan kecepatan pembelahan diri atau disebut juga laju pertumbuhan.

5.3 Fase Pertumbuhan Stasioner (*stationary phase*)

Fase stasioner ditandai dengan terhentinya pertumbuhan dari sel-sel. Kecepatan pertumbuhan tergantung dari kadar substrat, oleh karena itu menurunnya kecepatan pertumbuhan sudah terjadi ketika kadar substrat berkurang sebelum substrat habis terpakai. Dengan demikian pengalihan dari fase eksponensial ke fase stasioner terjadi berangsur-angsur. Selain keterbatasan substrat, ada juga faktor-faktor lain yang menyebabkan menurunnya kecepatan pertumbuhan. Faktor-faktor itu antara lain kepadatan populasi yang tinggi, tekanan parsial oksigen yang rendah dan timbunan produk metabolisme yang toksik. Pada fase stasioner, bahan-bahan simpanan masih dapat digunakan sebagian ribosom dapat diuraikan dan masih ada pembentukan enzim. Hanya sel yang amat rentan saja yang cepat mati. Selama energi yang dibutuhkan untuk mempertahankan sel-sel masih dapat diperoleh dengan respirasi bahan simpanan dan protein, bakteri masih mampu mempertahankan hidup untuk masa yang panjang. Pada fase stasioner, konsentrasi biomassa mencapai maksimum.

5.4 Fase Kematian (*death phase*)

Fase kematian ditandai dengan berkurangnya jumlah sel hidup (*viable*) dalam media akibat terjadinya kematian (*mortalitas*). Jumlah sel hidup dapat berkurang secara eksponensial. Hal ini disebabkan karena tidak adanya lagi substrat yang dapat mendukung pertumbuhan bakteri ataupun karena akumulasi produk samping metabolisme yang bersifat toksik. Pada beberapa bakteri pada fasa ini terjadi pembentukan endospora, contoh *Bacillus* dan *Clostridium*.

2.3.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Faktor-faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah:

a Substrat

Semua bakteri membutuhkan substrat sebagai sumber karbon dan energi. Karbon diperlukan untuk pertumbuhan sel dan reproduksi. Sumber karbon dari bakteri adalah senyawa organik. Senyawa organik sebagian terasimilasi ke dalam substansi sel dan sebagian dioksidasi untuk memperoleh energi. Senyawa-senyawa organik alamiah yang banyak terdapat di bumi adalah polisakarida,

selulosa, dan pati. Komponen monomer dari senyawa ini yang paling banyak dimanfaatkan adalah glukosa.

Bakteri juga memerlukan mineral-mineral dan zat pelengkap lainnya yang disebut suplemen. Mineral-mineral yang dibutuhkan antara lain mangan, molibden, seng, tembaga, dan masih banyak lagi. Sedangkan zat-zat pelengkap yang dibutuhkan terdiri dari 3 kelompok zat, yaitu asam-asam amino, senyawa purin, senyawa pirimidin.

Pada dasarnya kebutuhan nutrisi bakteri hampir sama dengan komposisi dari sel-sel bakteri tersebut. Struktur kimia bakteri diperkirakan mendekati $C_5H_7O_2N$. Karbon diperoleh dari senyawa organik seperti glukosa, tetapi ada juga beberapa yang menggunakan senyawa anorganik, seperti karbonat dan bikarbonat sebagai sumber karbon. Hidrogen dan oksigen diperoleh dari air. Nitrogen, fosfor, dan sulfur diperoleh dari senyawa organik dan anorganik.

b Temperatur

Salah satu parameter fisik yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah temperatur. Setiap mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada temperatur dengan rentang tertentu. Berdasarkan temperatur, bakteri dapat dibedakan menjadi tiga golongan seperti tampak pada tabel.

Tabel 2. 4 Klasifikasi bakteri berdasarkan temperatur

Bakteri	Rentang Temperatur ($^{\circ}C$)
Termofilik	40-80
Mesofilik	10-45
Psikrofilik	0-35

Banyak reaksi kimia di dalam metabolisme bakteri yang dipengaruhi oleh panas, semakin tinggi temperatur maka semakin baik reaksi kimia yang terjadi. Namun akan terjadi saat dimana temperatur dapat merubah struktur enzim sehingga menyebabkan turunnya aktivitas bakteri. Temperatur ini disebut temperatur maksimum dimana bakteri dapat hidup dan beraktivitas.

c pH

pH mempengaruhi kemampuan mikroorganisme untuk mengadakan transpor membran sel dan kesetimbangan dari reaksi katalisis. Kebanyakan bakteri tumbuh dengan subur pada pH netral. Pada pH 5 atau kurang dari itu, pertumbuhan bakteri sangat lambat. Pada umumnya pH harus mendekati 7 dengan rentang 4-10 agar bakteri dapat tumbuh. Untuk oksidasi nitrogen dan fermentasi metana, rentang pH terbatas dari 6-8. Degradasi hidrokarbon menjadi lebih cepat pada pH diatas 7.

Mempertahankan nilai pH tertentu sepanjang pertumbuhan, mempunyai arti penting bagi mikroorganisme. Ada bakteri yang tidak tahan terhadap asam tetapi menghasilkan asam dalam metabolismenya, seperti *Lactobacillus*, *Enterobacteriace*, dan banyak *Pseudomonas*. Hal ini dapat menyebabkan terhentinya pertumbuhan dan menyebabkan kematian. Untuk menghindari kematian bakteri akibat asam dapat digunakan substrat yang tidak dapat diragikan atau dengan mendaparkan media baik. Fosfat anorganik dapat mengembangkan efek dari dapar tertentu diatas pH 7.2. Kalsium karbonat atau natrium bikarbonat juga dapat ditambahkan untuk menaikkan pH.

pH yang terdapat di lingkungan tidak sepenuhnya disebabkan oleh aktivitas bakteri tetapi juga adanya garam anorganik di dalam tanah dan air mineral. Kemampuan bakteri untuk mengubah pH adalah akibat adanya interaksi antara spesies. Penggunaan karbon dan energi, efisiensi penggunaan substrat, sintesis protein, sintesis berbagai material dan pelepasan produk metabolisme dari sel, sangat dipengaruhi oleh perubahan pH.

d Oksigen

Bakteri aerob memerlukan oksigen untuk dua tujuan, tujuan yang paling utama adalah sebagai sumber akseptor elektron untuk sistem transport elektron. Sedangkan tujuan yang lain adalah untuk reaksi enzim tertentu. Oksidasi dari hidrokarbon membutuhkan oksigen. Bakteri yang hidup tanpa oksigen tidak dapat mendegradasi hidrokarbon (Dina kuswardini, 2004).

2.3.3 Kinetika Pertumbuhan Bakteri - Substrat

Faktor-faktor pertumbuhan bakteri seperti konsentrasi substrat, pH, dan tingkat nutrisi dapat mempengaruhi utilisasi substrat, sintesis protein, dan mengubah sintesis sitoplasma dan memodifikasi pelepasan intermediet (Lakshmi dan Velan, 2011). Untuk biodegradasi sempurna, perlu diperhatikan desain proses yang optimal. Pemilihan parameter fisika kimia penting untuk kulturisasi bakteri yang sesuai. Oleh karena itu, kondisi operasi harus ditentukan sebelumnya untuk mendapatkan proses biodegradasi yang baik. Selain itu, model-model kinetik digunakan pada data pertumbuhan percobaan untuk melihat pengaruh substrat terhadap pertumbuhan biomasnya.

Tabel 2. 5 Model-model kinetik biodegradasi

Model Kinetik	Substrat	Persamaan	Referensi
Simple Monod	Substrat tunggal, tanpa inhibisi	$\mu_s = \frac{\mu_{max} [S]}{K_m + [S]}$	Sgountzos et al., 2006
Kinetik Haldane	Phenol, m-Cresol	$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$	Bai et al., 2006
Kinetik Luong	Caffeine	$\mu = \frac{\mu_m [S]}{K_m + [S]} \left(1 - \frac{S}{S_m}\right)^n$	Gokulakrishnan dan Gummadi, 2005
Double Exponential	Caffeine	$\mu = \mu_m [e^{(-S/K_1)} - e^{(-S/K_2)}]$	Gokulakrishnan dan Gummadi, 2005
Kinetik Edward	Caffeine	$\mu = \frac{\mu_m [S]}{K_m + [S]} e^{(-S/K_1)}$	Gokulakrishnan dan Gummadi, 2005
Andrew's Model	Phenol	$\mu = \frac{\mu_A S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$ $\mu_A = \mu_{max} \left(1 + 1\sqrt{(K_S/K_i)}\right)$	Sgountzos et al., 2006
Monod (Diferensial)	PAHs	$\ln r = -\ln k + n \ln C$	Yudono et al., 2010
Monod (Integral)	PAHs	Orde 0: $[C]_t = -kt + [C]_0$ Orde 1: $\ln[C]_t = -kt + \ln[C]_0$	Eibes et al., 2005 Dan et al., 2006 Cottin dan Merlin, 2007

		Orde 2: $\frac{1}{[C]_t} = -kt + \frac{1}{[C]_0}$	Yudono et al., 2010 Ting et al., 2011
--	--	--	--

Neraca massa untuk sel bakteri dan substrat dalam sistem *batch* pada volume konstan dapat dituliskan sebagai berikut:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad (2.2)$$

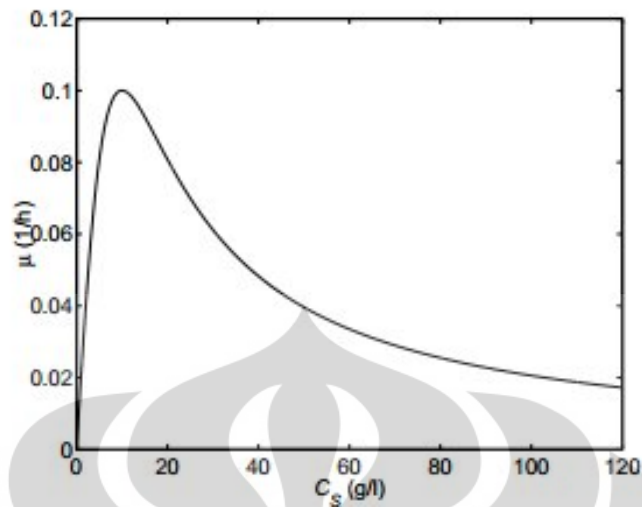
Dimana X adalah konsentrasi biomassa ($mg L^{-1}$), S konsentrasi substrat ($mg L^{-1}$), t waktu (h), dan $Y_{X/S}$ koefisien yield serta μ laju pertumbuhan spesifik biomassa (bakteri) (h^{-1}). Kinetika Monod menggambarkan laju pertumbuhan spesifik yang hanya dapat digunakan jika diasumsikan tidak ada inhibisi substrat pada konsentrasi yang tinggi.

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \quad (2.3)$$

Dimana μ_{max} merupakan laju pertumbuhan spesifik maksimum (h^{-1}) dan K_S konstanta setengah jenuh ($mg L^{-1}$). Disisi lain, jika substrat menghambat pertumbuhan mikroba pada konsentrasi substrat yang tinggi, terdapat konsentrasi kritis dimana laju pertumbuhan spesifik mikroorganisme menurun dengan peningkatan konsentrasi substrat. Hal itu dapat digambarkan secara matematis melalui persamaan Haldane berikut:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.4)$$

Dimana K_i adalah konstanta inhibisi ($mg L^{-1}$). Laju pertumbuhan spesifik dihitung pada saat awal fase eksponensial pertumbuhan bakteri pada setiap konsentrasi awal substrat yang divariasikan dan diuji. Data biomassa dari setiap percobaan *batch* yang diujikan diplot pada grafik semi-logaritmik vs waktu.

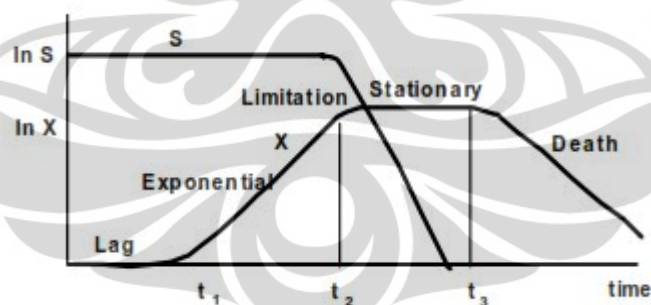


Gambar 2. 6 Kinetika Haldane
(Sumber: Keesman dan Stigter, 2002)

Selama fase awal pertumbuhan bakteri, S dapat ditetapkan sama dengan konsentrasi awal substrat, sehingga persamaan (2.1) dapat dituliskan sebagai berikut:

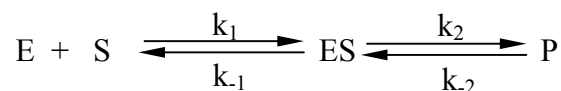
$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t \quad (2.5)$$

Dimana X_0 merupakan konsentrasi awal biomassa ($mg L^{-1}$). Laju pertumbuhan spesifik μ didapat dari slope biomassa pada plot grafik semi-logaritmik.



Gambar 2. 7 Kinetika mikroba sederhana
(Dunn et al., 2006. *Bioreaction Engineering*)

Michaelis – Menten menjelaskan reaksi yang melibatkan substrat tunggal sebagai salah satu kasus paling sederhana dari sebuah reaksi yang melibatkan enzim sebagai katalis. Kebergantungan reaksi terhadap konsentrasi substrat dalam banyak kasus ditunjukkan dalam skema berikut:

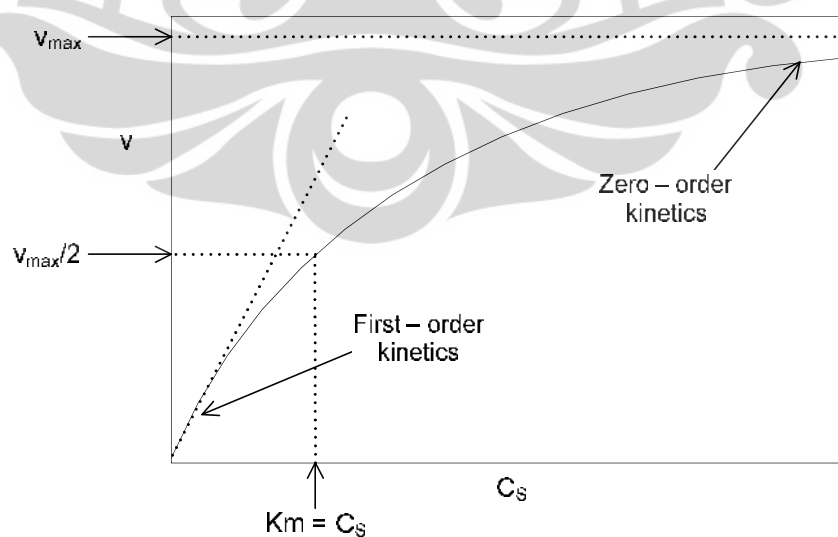


Gambar 2. 8. Skema reaksi enzimatik dengan satu substrat

Laju reaksi bervariasi secara linear terhadap konsentrasi substrat pada saat konsentrasi rendah (kinetika orde satu), kemudian menjadi independen terhadap konsentrasi substrat saat konsentrasi tinggi (kinetika orde nol). Perilaku semacam ini, pertama kali dijelaskan oleh Michaelis-Menten dalam bentuk mekanisme seperti gambar 2.7. Di sini **S** dan **E** adalah substrat dan enzim, **P** merupakan produk, dan **ES** merupakan sebuah kompleks enzim-substrat. Persamaan Michaelis-Menten dapat ditulis:

$$v = \frac{v_{\max} C_S}{K_m + C_S} \quad (2.6)$$

Saat konsentrasi substrat jauh sangat kecil, $C_S \ll K_m$, sehingga reaksi akan mengikuti kinetika orde pertama terhadap konsentrasi substrat. Sebaliknya saat konsentrasi substrat jauh lebih besar dibandingkan K_m , $C_S \gg K_m$, maka reaksi akan berjalan dengan kinetika reaksi orde nol. Enzim kemudian akan jenuh terhadap substrat, dan lebih jauh kenaikan konsentrasi substrat tidak akan berdampak lagi terhadap laju reaksi. Semua fenomena ini ditunjukkan pada gambar berikut:



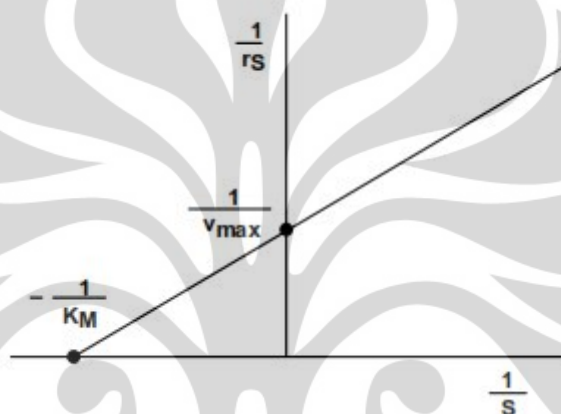
Gambar 2. 9. Laju reaksi-konsentrasi substrat untuk reaksi kinetika Michaelis-Menten

Atau dalam pembuatan grafik Lineweaver-Burk, dapat diturunkan sebagai berikut:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{C_S} + \frac{1}{v_{max}} \quad (2.7)$$

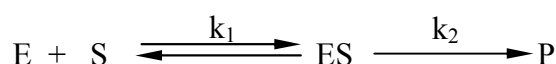
dimana v_{max} (laju reaksi maksimum), merupakan laju reaksi tercepat pada konsentrasi substrat yang tinggi. Saat C_S setara dengan K_m , maka persamaan (2.6) dapat ditulis ulang menjadi

$$v = \frac{v_{max} C_S}{C_S + C_S} = \frac{v_{max}}{2} \quad (2.8)$$



Gambar 2. 10. Grafik Lineweaver-Burk
(Sumber: Dunn et al., 2006)

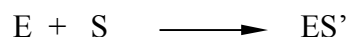
Modifikasi model Michaelis Menten dapat dilakukan jika yang dipakai sangat berlebih atau pada konsentrasi yang cukup tinggi, sehingga reaksi dapat disederhanakan menjadi model substrat tunggal. Alkohol diketahui secara umum dapat menghambat katalis enzim dengan cara dehidrasi osmosis permukaan sel dan/atau mengganggu pH interseluler, sehingga model inhibisi substrat dan inhibisi kompetitif produk diasumsikan untuk menggambarkan reaksi tersebut. Tahap dasar untuk reaksi berkatalis enzim digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2. 11. Tahap dasar reaksi berkatalis enzim

E merupakan enzim, **S** adalah substrat, **P** adalah produk dan **ES** merupakan kompleks enzim-substrat. Inhibisi substrat akan mengarahkan ke satu persamaan lain, seperti ditunjukkan di bawah ini, yang mengindikasikan

penghalangan daerah aktif enzim oleh substrat untuk membentuk kompleks non-reaktif ES'.



Gambar 2. 12. Inhibisi kompetitif substrat

Inhibisi kompetitif produk akan mengarahkan ke mekanisme lain, yaitu:



Gambar 2. 13. Inhibisi kompetitif produk

Disini, produk diasumsikan menghambat sisi aktif enzim untuk membentuk *dead-end complex*. Berikut beberapa macam inhibisi enzimatik – substrat dengan mekanisme dan persamaan reaksinya:

Tabel 2. 6 Kinetik inhibisi enzimatik substrat

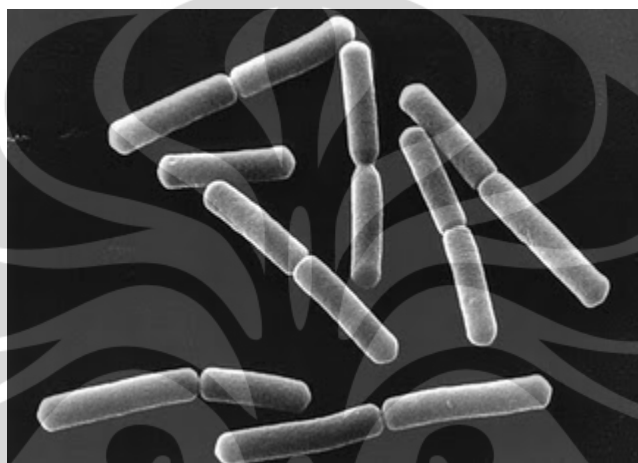
Inhibisi	Mekanisme	Persamaan reaksi (v)
Kompetitif	$E+I \rightleftharpoons EI$	$\frac{v_{max}C_S}{K_m(1+I/K_I)+C_S}$
Ankompetitif	$ES+I \rightleftharpoons ESI$	$\frac{v_{max}C_S}{K_m+C_S(1+I/K_I)}$
Non-kompetitif	$\begin{array}{c} E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow P \\ \updownarrow \quad \updownarrow \\ EI \rightleftharpoons ESI \end{array}$	$\frac{v_{max}C_S}{(1+I/K_I)(K_m+C_S)}$

(Sumber: Dunn et al., 2006)

2.3.4 Mikroorganisme dalam Biodegradasi Pyrena (*Bacillus subtilis*)

Pada dasarnya bakteri yang dapat mendegradasi pyrena adalah bakteri yang menyukai hidrokarbon sebagai sumber energi dalam pertumbuhannya, atau biasa disebut bakteri petrofilik. Bossert dan Bartha (1984) dalam Udiharto (1992) telah menemukan 22 genera bakteri yang hidup di lingkungan minyak bumi. Isolat yang mendominasi di lingkungan tersebut antara lain *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acenitobacter*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium* dan *Pseudomonas*.

Bacillus merupakan bakteri yang memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi pada lingkungan tempat tinggalnya. Bakteri ini mampu menggunakan komponen organik sebagai sumber makanan. Berdasarkan kemampuannya tersebut, *Bacillus* digunakan dalam mendegradasi senyawa kontaminan organik seperti *styrene*, *trinitrotoluene*, PAHs, serta senyawa organik lainnya. *Bacillus* yang umum digunakan dalam degradasi hidrokarbon antara lain adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* dan *Bacillus pumilis*.



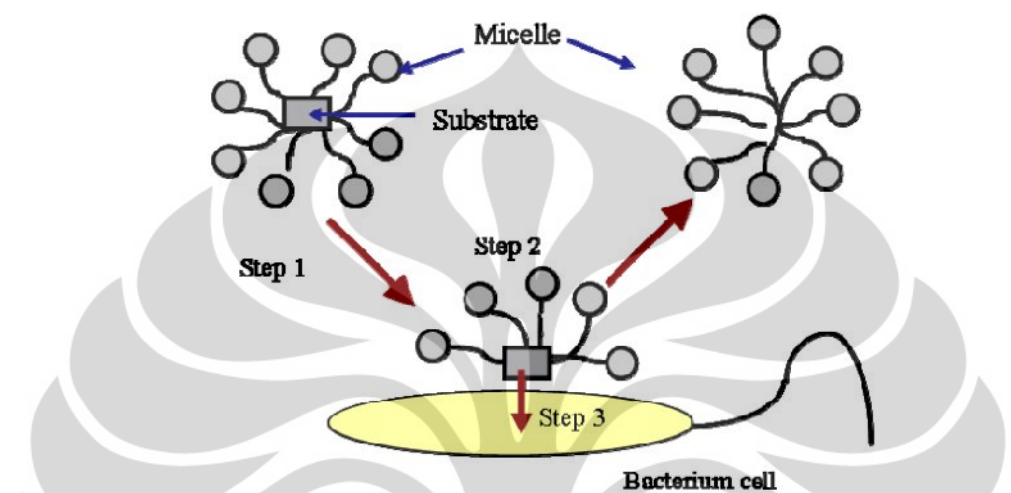
Gambar 2. 14 Bakteri *Bacillus subtilis*
(Sumber: <http://lutfiblurry.blogspot.com>, 2011)

Secara umum bakteri *Bacillus subtilis* memiliki karakteristik sebagai berikut:

- a Salah satu kelompok bakteri gram positif dan berukuran 0.5-2.5 μm x 1.0-1.2 μm
- b *Bacillus subtilis* membentuk endospora yang protektif yang memberi kemampuan bakteri tersebut mentolerir keadaan yang ekstrim.
- c Merupakan jenis kelompok bakteri termofilik yang dapat tumbuh pada kisaran suhu 5°C – 55 °C dan mempunyai pertumbuhan suhu optimum pada suhu 60 °C – 80 °C.

2.3.5 Konsumsi Substrat oleh Bakteri

Bakteri *Bacillus* yang merupakan jenis bakteri petrofilik menggunakan substrat hidrokarbon sebagai sumber karbon dalam metabolismenya. Mekanisme bakteri dalam degradasi hidrokarbon erat kaitannya dengan konsumsi substrat oleh bakteri yang melibatkan perpindahan substrat terlarut ke dalam sel.



Gambar 2. 15 Konsumsi substrat oleh bakteri dalam proses biodegradasi
(Sumber: Li dan Chen, 2009)

Biodegradasi hidrokarbon meliputi degradasi molekul hidrokarbon baik di fase cair dan fase misel. Biodegradasi molekul hidrokarbon juga ditentukan oleh difusi molekul ke permukaan sel atau sisi enzim. Molekul-molekul dalam fase misel mengalami degradasi baik oleh difusi pertama ke dalam fase cair dan kemudian digunakan oleh bakteri atau dengan penyerapan langsung oleh mikroba dari misel. Proses pertama dikendalikan oleh kinetika agregasi misel. Waktu relaksasi dari misel biasanya pada ukuran milidetik ke mikrodetik. Oleh karena itu, proses pertama biasanya bukanlah tahapan yang membatasi laju degradasi. (Li dan Chen, 2009).

Gambar 2.15 menjelaskan tahapan kedua mekanisme pelarutan substrat ke dalam sel yang biasanya menentukan dan dominan dalam proses degradasi. Seperti terlihat pada gambar, perpindahan massa dari misel ke sel terjadi dalam tiga tahapan. Tahapan pertama adalah pengangkutan misel terlarut dengan substrat ke sekitar sel-sel atau enzim oleh pencampuran. Tahapan kedua adalah pertukaran misel diisi dengan lapisan hemimicellar molekul surfaktan terbentuk di sekitar sel. Tahapan ketiga, perpindahan substrat dari hemimisel ke dalam sel. Pada sistem

pencampuran yang baik, tahapan kedua dan ketiga adalah tahapan yang menentukan biodegradasi substrat dalam fase miselar. Proses tersebut dipengaruhi oleh interaksi spesifik antara misel dan permukaan sel, seperti halnya afinitas dua permukaan, yang merupakan salah satu faktor penting dalam perpindahan substrat dari misel ke sel.

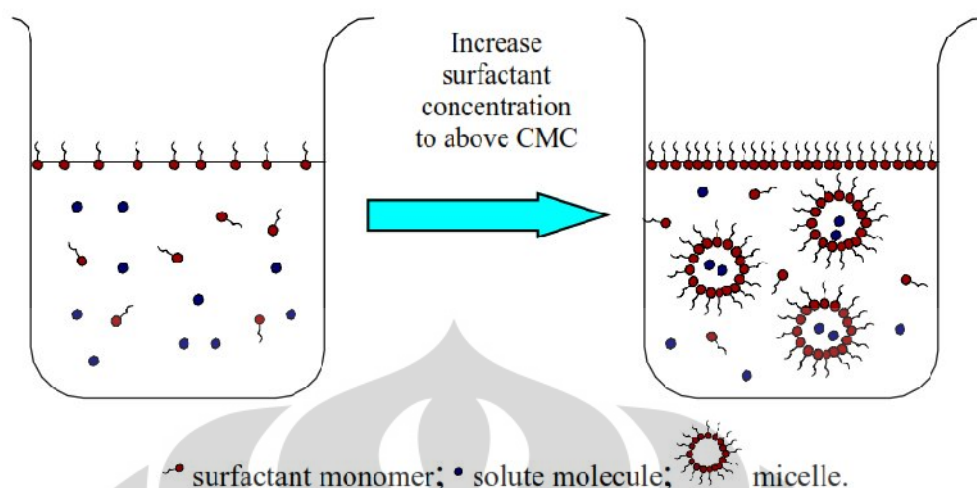
2.4 Biosurfaktan dalam Biodegradasi

2.4.1 Senyawa Aktif Permukaan (*surface active agent*)

Belakangan ini, ketertarikan terhadap agen aktif permukaan cukup meningkat. Banyak jenis dari agen aktif permukaan yang disintesis oleh berbagai jenis mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan dalam proses biodegradasi dengan toksisitas yang rendah dan biaya relatif murah (Queiroga et al., 2003). Surfaktan adalah molekul amphipatik yang terdiri atas gugus hidrofilik dan hidrofobik, sehingga dapat berada diantara cairan yang memiliki sifat polar dan ikatan hidrogen yang berbeda, seperti minyak dan air. Hal ini disebabkan surfaktan mampu mereduksi tegangan permukaan dan membentuk mikroemulsi sehingga hidrokarbon dapat larut di dalam air, dan sebaliknya.

Surfaktan ini dapat diaplikasikan pada berbagai jenis industri seperti produksi deterjen, emulsifier, cat, tinta, untuk formulasi herbisida dan insektisida dalam bidang agrokimia. Dalam bidang lingkungan, tujuan penggunaan surfaktan adalah untuk meningkatkan *bio-availability* senyawa polutan yang memiliki kadar solid yang tinggi sehingga dapat menjadikannya lebih mudah larut terhadap pelarut atau media (Nitschke et al., 2004).

Molekul surfaktan dapat terakumulasi bersama pada interfase gas-cair dan cair-cair dan mereduksi tegangan permukaan dan tegangan interfisial pada waktu yang sama. Selain itu, jika konsentrasi surfaktan melebihi nilai tertentu, pada CMC (*critical micelle concentration*), pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruang, ikatan surfaktan pada larutan akan teragregat membentuk misel berukuran koloidal. Pada kondisi tersebut, ikatan hidrofobik akan membentuk inti hidrofobik dengan substrat dan dinamakan solubilisasi.



Gambar 2. 16 Pembentukan misel dalam air dan solubilisasi
(Sumber: Li dan Chen, 2009)

Pada konsentrasi surfaktan di atas CMC, solubilitas hidrokarbon meningkat secara linier dengan konsentrasi surfaktan. Sebagai bagian dari solubilitas, kinetik pemutusan ikatan hidrokarbon juga merupakan faktor penting dalam menentukan biodegradasi. Surfaktan juga dapat meningkatkan perpindahan massa polutan hidrofobik dari padatan atau fase tak larut larutan ke fase larut dengan menurunkan tegangan interfasial dan mengakumulasi senyawa hidrofobik di dalam misel (Li dan Chen, 2009).

Kebutuhan akan surfaktan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya proses-proses yang membutuhkan senyawa aktif permukaan. Surfaktan banyak dibutuhkan antara lain dalam proses bioremediasi, industri petrokimia, dan dalam meningkatkan perolehan minyak bumi EOR (*Enhanced Oil Recovery*). Surfaktan dapat dipergunakan untuk mempercepat remediasi lingkungan yang tercemar oleh tumpahan limbah minyak bumi, yaitu dengan meningkatkan daya kelarutan minyak bumi. Selanjutnya pencemar didegradasi oleh sel-sel mikroorganisme, melalui pembentukan butiran-butiran minyak bumi yang terdispersi dalam air.

Peningkatan solubilitas PAHs dengan aplikasi surfaktan sebagai *mobilizing agents*. Efek surfaktan pada *availability* dari senyawa organik digambarkan pada mekanisme utama yaitu: dispersi dari senyawa organik yang tidak larut air, NAPL (*nonaqueous-phase liquid*), meningkatkan luas area kontak dengan mengurangi tegangan antar permukaan fase air dan fase hidrokarbon

(tidak larut air), meningkatkan kelarutan dari polutan, dan menjadi *facilitated transport* dari polutan organik pada fase padat, dengan mengurangi tegangan permukaan air pada partikel padat.

Ada beberapa pendekatan yang digunakan pada cara kerja misel surfaktan. Pada pendekatan pertama, sel mikroba dapat mengikat polutan organik dari *micellar core* surfaktan. Pendekatan kedua, surfaktan meningkatkan transfer masa dari polutan kedalam fase air untuk selanjutnya digunakan oleh mikroba. Pendekatan ketiga, penambahan dari surfaktan mengubah *hydrophobicity* dari sel, memfasilitasi kontak langsung sel dengan NAPLs (*nonaqueous-phase liquid*). Dan mekanisme pendekatan keempat adalah surfaktan membantu adsorpsi mikroba pada permukaan partikel padat yang tercemar polutan organik dengan meningkatkan *site of adsorption* dan *site of bio-uptake* dari mikroba.

2.4.2 Pengaruh Penambahan Biosurfaktan pada Biodegradasi

Biosurfaktan memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan surfaktan kimia, seperti toksisitas rendah, kemampuan biodegradabilitas tinggi, kompatibilitas lingkungan lebih baik, dan potensial untuk diproduksi secara *in situ*, efektif pada kondisi suhu, pH, dan salinitas yang ekstrim. Pembentukannya relatif mudah dan tidak perlu perlakuan khusus setelah terjadi reaksi, sehingga penggunaan biosurfaktan relatif mudah dan ramah lingkungan.

Penggunaan surfaktan merupakan cara untuk meningkatkan bioavailabilitas penyerapan PAHs dengan meningkatkan kelarutan kontaminan (pyrena) dalam air. Analisa efisiensi biodegradasi diukur dengan analisa pengukuran TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) dan pertumbuhan mikroba seiring proses biodegradasi (Helmy et al., 2010).

Pengaruh positif surfaktan dalam biodegradasi hidrokarbon telah dikaitkan pada meningkatnya solubilitas dan pemutusan hidrokarbon atau meningkatnya perpindahan massa dengan kehadiran surfaktan. Disamping itu, ada beberapa faktor yang memberikan pengaruh negatif surfaktan dalam biodegradasi hidrokarbon.

a Toksisitas surfaktan

Surfaktan yang bersifat racun pada bakteri akan menghambat perkembangbiakan sel dan mengurangi efisiensi dalam mendegradasi PAHs.

Molekul racun surfaktan akan menginduksi apoptosis sel bergantung pada konsentrasi surfaktan (Partearoyyo et al., 1990; Perani et al., 2001). Molekul surfaktan pada konsentrasi yang tinggi (CMC atau di atas CMC) dapat membentuk misel yang bercampur dengan molekul lipid, penggabungan monomer surfaktan ke dalam membran sel yang cukup untuk merusak fungsi pembatas dari membran sel.

Berdasarkan muatannya, surfaktan dibagi dalam surfaktan nonionik dan ionik. Surfaktan ionik juga dapat dikategorikan dalam surfaktan kationik, anionik dan zwitteronik. Secara umum, surfaktan nonionik sedikit toksik pada mikroorganisme daripada surfaktan ionik. Toksisitas surfaktan juga bergantung pada struktur molekul. Toksisitas menurun dengan meningkatnya hidrofilitas (HLB) surfaktan. Dari hasil pengamatan, Li dan Chen (2009) mengategorikan peningkatan toksisitas surfaktan sebagai berikut: Surfaktan nonionik (Tween 80, Brij30, 10LE, Brij35) < surfaktan anionic (LAS) < surfaktan anionik (TDTMA).

b Biodegradasi surfaktan

Biodegradabilitas surfaktan merupakan salah satu faktor yang menentukan kemampuannya diaplikasikan dalam bioremediasi *in-situ*. Jika surfaktan mudah terdegradasi pada mikroorganisme, sangat memungkinkan surfaktan menjadi kompetitif sebagai sumber karbon, yang mempengaruhi degraasi substrat utama. Di sisi lain, biodegradasi surfaktan dapat menyebabkan pelepasan lebih banyak PAHs dari fase miselar ke dalam fase terlarut, yang meningkatkan bioavailabilitasnya. Bagaimanapun, surfaktan yang dapat dengan mudah terdegradasi akan kehilangan kapasitas solubilisasinya dan menyebabkan tujuan solubilisasi menjadi tidak efektif. Oleh karena itu, dalam aplikasi, keseimbangan harus ditemukan antara biodegradabilitas dari surfaktan dan pengaruhnya pada biodegradasi polutan.

2.4.3 Pelarutan Substrat oleh Biosurfaktan

Telah diketahui bahwa biosurfaktan berfungsi untuk meningkatkan bioavailabilitas penyerapan PAHs dengan meningkatkan kelarutan kontaminan (substrat) dalam air. Sejak fase misel berisi sebagian besar substrat terlarut, bioavailabilitas hidrokarbon terlarut menentukan biodegradasi substrat

keseluruhan. Bioavailibilitas dari hidrokarbon pada fase misel telah dipelajari secara kualitatif dan kuantitatif (Li dan Chen, 2009).

Tiehm (1995) melaporkan pola pertumbuhan eksponensial yang diamati pada kultur campuran pada *phenanthrene* dan *fluoranthrene* yang dilarutkan oleh surfaktan nonionik, yang menunjukkan bioavailibilitas tinggi dari hidrokarbon terlarut. Liu et al, (1995) juga menghitung bioavailibilitas misel dengan naftalena terlarut terhadap mikroorganisme degradasi naftalena dengan dua surfaktan nonionik, Brij 30 dan Triton X-100 yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa naftalena dilarutkan oleh misel surfaktan bersifat bioavailibel dan terdegradasi oleh kultur campuran bakteri.

Guha dan Jaffe (1996) mempelajari kinetika biodegradasi dari fenantrena dan campuran PAH yang terbagi menjadi fase misel surfaktan nonionik. Bioavailibilitas fenantrena digambarkan oleh konsentrasi efektif dari fenantrena dalam larutan misel yang tersedia untuk biodegradasi. Konsentrasi efektif (C_e), dapat diasumsikan secara konseptual meliputi molekul fenantrena terlarut dalam fase cair (C_a) dan fraksi (f) dari fenantrena terlarut dalam fase misel yang dapat langsung diakses dan dikonsumsi oleh bakteri,

$$C_e = C_a + f \cdot C_{mic} \quad (2.9)$$

Dimana f merupakan koefisien bioavailibilitas ($0 < f < 1$), tergantung konsentrasi surfaktan, dan C_a (mg/L) serta C_{mic} (mg/L) masing-masing adalah konsentrasi surfaktan pada fase cair dan fase miselar. Dengan $f = 1$ dan $C_e = C$ sehingga $C = C_{mic} + C_a$, merupakan konsentrasi *bulk* fenantrena dalam larutan surfaktan.

Percobaan dan modeling pada sedikit surfaktan menunjukkan bahwa nilai koefisien bioavailibilitas f tergantung pada struktur molekul dan konsentrasi surfaktan. Berdasarkan hasil yang didapat, koefisien bioavailibilitas surfaktan nonionic Brij 35 adalah nol. Artinya mikroorganisme yang digunakan dalam percobaan tidak bisa mendapatkan fenantrena dalam misel, sedangkan, nilai f dari polietilen (9.5) *glikol eter nonylphenyl* (Triton N101), Triton X-100, dan Brij 30 adalah antara 0 dan 1.

Dengan peningkatan konsentrasi surfaktan, f mendekati nol, menunjukkan bahwa molekul fenantrena dalam misel tidak dapat diambil oleh sel-sel secara

langsung. Dengan kata lain, molekul substrat harus dipindahkan dari fase misel ke fase cair menjadi bioavailabel terhadap bakteri. Selain itu, dinyatakan juga bahwa f tidak hanya merupakan fungsi dari surfaktan, tetapi kemungkinan besar juga dari kultur bakteri. Lebih lanjut lagi, mekanisme bioavailabilitas senyawa hidrofobik dipartisi ke dalam fase misel surfaktan nonionik juga diamati (Guha dan Jaffe, 1998).

Zhang et al., (1997) mempelajari efek biosurfaktan pada pemutusan ikatan, bioavailabilitas, dan biodegradasi fenantrena. Sebuah model matematika yang digunakan untuk menggambarkan efek gabungan dari solubilisasi, biodegradasi, dan bioavailabilitas fenantrena dalam misel surfaktan. Bioavailabilitas substrat dalam misel ditemukan tergantung pada surfaktan yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengaruh surfaktan pada biodegradasi merupakan kombinasi dari kekuatan pelarut dari surfaktan dan bioavailabilitas dari substrat dalam misel surfaktan.

Li dan Chen (2008) mempelajari biodegradasi fenantrena dengan adanya surfaktan nonionik alkohol linier etoksilat. Bioavailabilitas fenantrena dalam larutan misel surfaktan diselidiki berdasarkan tingkat solubilisasi dari fenantrena. Pada kesetimbangan solubilisasi:

$$C_{mic} = S_{mic} K_{mw} C_a \quad (2.10)$$

Dimana S_{mic} (mg/L) adalah konsentrasi surfaktan dalam fase miselar dan K_{mw} (L/mg) adalah koefisien fenantrena misela-air, yang didefinisikan sebagai rasio konsentrasi fenantrena pada fase miselar (C_m) (mg phenanthrene/mg misel surfaktan) terhadap konsentrasi fenantrena dalam fase cair (C_a) (mg/L) :

$$K_{mw} = \frac{C_m}{C_a} = \frac{C_{mic}}{S_{mic} C_a} \quad (2.11)$$

Jika α didefinisikan sebagai fraksi sebagian substrat dalam fase miselar pada tingkat solubilisasi, $\alpha = C_{mic}/C$, persamaan di atas dapat dituliskan sebagai:

$$K_{mw} = \frac{C_m}{C_a} = \frac{C_{mic}}{S_{mic} C_a} = \frac{\alpha C}{S_{mic}(1-\alpha)C} = \frac{\alpha}{S_{mic}(1-\alpha)} \quad (2.12)$$

$$\frac{1}{\alpha} = 1 + \frac{1}{S_{mic} K_{mw}} \quad (2.13)$$

Persamaan 2.13 menggambarkan tingkat solubilisasi (α), meningkat dengan konsentrasi surfaktan (S_{mic}), dan tidak tergantung pada konsentrasi

fenantrena (C). Hal ini dapat dimengerti karena distribusi fenantrena dalam dua fasa, yakni fasa cair dan fasa miselar, ditentukan oleh bagian kesetimbangan dan jumlah misel dalam larutan miselar.

Dari persamaan-persamaan di atas, dapat dituliskan persamaan konsentrasi efektif (C_e) adalah sebagai berikut:

$$C_e = [1 - (1 - f) \cdot \alpha] \cdot C \quad (2.14)$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa konsentrasi efektif atau bioavailabilitas fenantrena dalam larutan misel berkurang dengan peningkatan konsentrasi surfaktan. Persamaan di atas juga menunjukkan bahwa, pada konsentrasi surfaktan konstan (yaitu α dan f konstan), konsentrasi efektif atau bioavailabilitas fenantrena dalam larutan miselar meningkat dengan konsentrasi fenantrena awal (C). Pada intinya, persamaan 2.14 menggambarkan bahwa biodegradasi fenantrena dalam larutan misel akan berbanding terbalik dengan konsentrasi surfaktan, dan ditingkatkan oleh konsentrasi awal fenantrena terlarut dalam larutan misel.

Telah diamati bahwa keberadaan surfaktan meningkatkan biodegradasi fenantrena karena kelarutannya meningkat, dibandingkan dengan biodegradasi tanpa adanya surfaktan. Namun, pada konsentrasi awal fenantrena tetap, dengan peningkatan konsentrasi surfaktan, menunjukkan efek penghambatan pada konsentrasi surfaktan yang lebih tinggi. Hal ini bisa disebabkan oleh rendahnya ketersediaan fenantrena yang dipartisi ke dalam fase misel. Dengan peningkatan konsentrasi surfaktan, tingkat solubilisasi (α) meningkat secara tajam dan kemudian mendekati 1. Ini berarti pada konsentrasi surfaktan yang tinggi, substrat berada pada fase misel.

Bioavailabilitas yang lebih rendah dari fenantrena dalam misel berkaitan terhadap biodegradabilitas yang lebih rendah secara keseluruhan pada konsentrasi surfaktan yang lebih tinggi. Mekanisme ini menunjukkan bahwa dengan hilangnya surfaktan selama proses degradasi, lebih banyak fenantrena yang dibebaskan dari fase misel ke fase cair, sehingga tersedia bagi bakteri.

Efek dari surfaktan pada biodegradasi PAH dan sebaliknya juga telah dilakukan (Chen et al., 2001). Telah diamati bahwa biodegradasi naftalen dan fenantrena bergantung pada surfaktan yang digunakan, dan adanya naftalena dan

fenantrena juga mempengaruhi biodegradasi surfaktan yang berbeda untuk tingkat yang berbeda.

Seperti disebutkan di atas, pengaruh surfaktan pada biodegradasi hidrokarbon merupakan kontribusi oleh banyak faktor secara bersamaan. bioavailabilitas substrat dalam fase misel menentukan kinerja surfaktan keseluruhan dalam proses bioremediasi. Untuk pemanfaatannya yang baik, pemilihan surfaktan mungkin adalah tahapan yang paling penting. Seperti surfaktan harus tidak beracun untuk mikroorganisme dan tidak menimbulkan masalah lingkungan, serta harus memiliki kapasitas solubilisasi baik untuk kontaminan yang ditargetkan.

2.4.4 Biosurfaktan Mikroorganisme

Biosurfaktan merupakan agen aktif permukaan biologis yang diproduksi oleh beberapa mikroorganisme. Sifat-sifat seperti toksisitas dan kemampuan biodegradasi sangat diterima secara lingkungan. Dengan kemampuan menurunkan tegangan permukaan dan interfasial secara efektif, biosurfaktan merupakan pengganti surfaktan sintetis yang potensial. Ini berarti bahwa biosurfaktan menjanjikan kegunaan surfaktan dalam industri makanan, farmasi, kosmetik, industri kimia, EOR (*Enhanced Oil Recovery*) serta pembersihan tumpahan minyak melalui bioremediasi (Thaniyavarn et al., 2003).

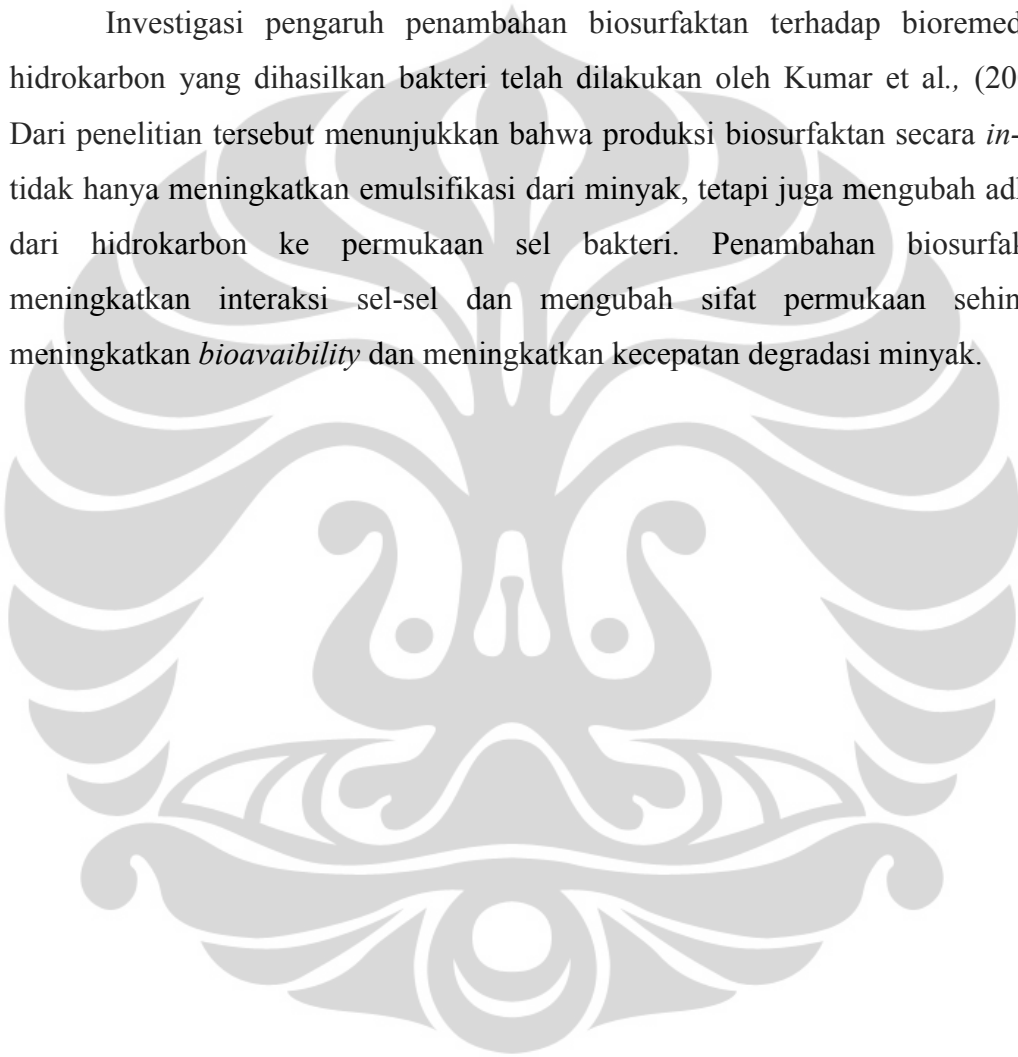
Biosurfaktan berfungsi sebagai katalis dan *emulsifier* untuk meningkatkan efisiensi bioremediasi *sludge* minyak. Efisiensi bioremediasi *sludge* (*hydrocarbon removal* dan *heavy metal removal*) dipengaruhi oleh konsentrasi katalis (biosurfaktan) dan karakteristik fisik dari biosurfaktan yang ditambahkan, serta jenis mikroba (tunggal atau konsorsium) dan kondisi lingkungan bioremediasi (Yuliani, 2010).

Ada beberapa kelas biosurfaktan, yakni:

- a Glikolipida
- b Lipopeptida atau lipoprotein
- c Lipida netral
- d Fosfolipida
- e Asam lemak tersubstitusi
- f Lipopolisakarida

Produksi biosurfaktan jenis lipopeptida secara efektif, surfaktin, pertama dilaporkan untuk strain *Bacillus subtilis*. Sejak saat itu, berbagai jenis lipopeptida dengan aktivitas permukaan dan atau aktivitas antibiotik telah diisolasi dari strain *Bacillus*, seperti basilomisin, iturin, mikosubtilin, pliplastatin, surfaktan BL86, halobasilin, dan lain-lain. Sejauh yang diketahui, produksi biosurfaktan selain lipopeptida belum pernah dilaporkan untuk strain *Bacillus*.

Investigasi pengaruh penambahan biosurfaktan terhadap bioremediasi hidrokarbon yang dihasilkan bakteri telah dilakukan oleh Kumar et al., (2006). Dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa produksi biosurfaktan secara *in-situ* tidak hanya meningkatkan emulsifikasi dari minyak, tetapi juga mengubah adhesi dari hidrokarbon ke permukaan sel bakteri. Penambahan biosurfaktan meningkatkan interaksi sel-sel dan mengubah sifat permukaan sehingga meningkatkan *bioavailability* dan meningkatkan kecepatan degradasi minyak.



Tabel 2. 7 Klasifikasi biosurfaktan dari beberapa mikroorganisme

Biosurfaktan		Mikroorganisme	Referensi
Kelompok	Kelas		
Glikolipid	Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sifour et al., (2007), Whang et al., (2008), Maier dan Chavez (2000)
		<i>Pseudomonas sp.</i>	
	Trehalopids	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Franzetti et al., (2010)
		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
		<i>Arthrobacter sp.</i>	
		<i>Nocardia sp.</i>	
	Sophorolipids	<i>Corynebacterium sp.</i>	
		<i>Torulopsis bombicola</i>	Whang et al., (2008)
		<i>Torulopsis petrophilum</i>	Pesce, L. A (2002)
	Asam lemak, fosfolipid	<i>Torulopsis apicola</i>	Baviere et al., (1994)
Corynomylic acid		<i>Corynebacterium lepus</i>	Gerzon dan Zajic (1978)
Spiculisporic acid		<i>Penicillium spiculisporum</i>	Ishigami et al., (2000), Hong et al., (1998)
Phosphat-dylethanamine	<i>Acinetobacter sp.</i>	Apanna et al., (1995)	
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		
Lipopeptida	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	Jennema et al., (1983), Awasthi et al., (1999)
	Lichenysin	<i>Bacillus licheniformis</i>	Thomas et al., (1993)
Polimer	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus RAG-1</i>	Zozim et al., (1982)
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens KA-53</i>	Toren et al., (2001)
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus A2</i>	Rosenberg et al., (1988)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	Cirigliano et al., (1984)
	Mannoprotein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cameron et al., (1988)

(Sumber: Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

2.4.5 Produksi dan Isolasi Biosurfaktan

Produksi biosurfaktan dapat dihasilkan dari proses pertumbuhan mikroorganisme secara aerobik dengan berbagai sumber karbon, misalnya karbohidrat, hidrokarbon, minyak (*oil*), lemak atau campuran keduanya (Jacobucci, 2001). Dengan memperhatikan sifat-sifat biosurfaktan baik sifat fisika dan kimianya dalam menurunkan permukaan zat cair dan stabilitas emulsi yang dibentuk dapat dilakukan evaluasi dalam menentukan mikroorganisme yang berpotensi melalui skrining mikroorganisme (Fatimah, 2001). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa biosurfaktan dapat diproduksi dengan substrat yang tidak larut air misalnya hidrokarbon dan substrat yang larut dalam air. Beberapa jenis biosurfaktan diperoleh dengan metode ekstraksi pengendapan dengan menggunakan amonium sulfat, antara lain senyawa pengemulsi dan biodispersi *Acinetobacter sp.*, bioemulsi dari bakteri gram negatif, dan pengemulsi dari *Bacillus subtilis* FE-2. Surfaktan dari *Bacillus subtilis* dan biosurfaktan dari *Bacillus licheniformis* diperoleh melalui pengendapan asam (Kosarik, 1993).

Sifour (2005) dan Salehizadeh & Mohammadizad (2009) melakukan isolasi biosurfaktan dengan pengendapan HCl 6M hingga pH 2 (kadar tinggi untuk mengurangi aktivitas air sehingga senyawa aktif permukaan yang semula larut dalam air akan terendapkan), kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan presipitasi pada 15000 rpm selama 15 menit. Presipitat dipisahkan dan ditambahkan kloroform:metanol (2:1,v/v) untuk mendapatkan ekstrak biosurfaktan.

2.5 State of the Art (Pemetaan Biodegradasi Pyrena)

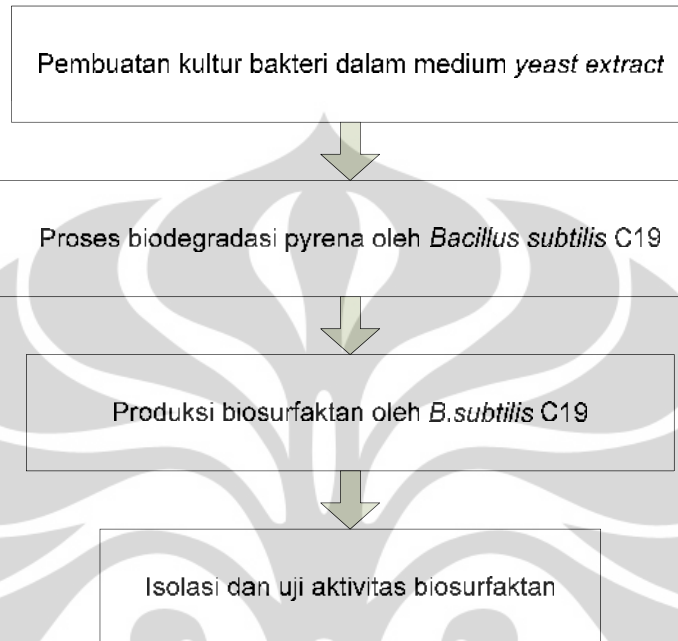
Penelitian biodegradasi pyrena dengan menggunakan berbagai macam bakteri telah banyak dilakukan, namun hanya sebagian kecil saja yang baru menggunakan bakteri jenis *Bacillus subtilis*. Selain itu, penelitian-penelitian sebelumnya tidak melakukan analisis terhadap metabolit (biosurfaktan) yang berperan dalam meningkatkan solubilitas pyrena dalam media kultur. Lebih lanjut lagi, masih sedikit penelitian yang membahas kinetika pertumbuhan mikroorganisme terhadap substrat kinetika reaksi biodegradasi pyrena dengan melihat ada tidaknya inhibisi oleh substrat dalam proses biodegradasi tersebut.

Tabel 2. 8 Pemetaan Penelitian Kinetika Biodegradasi Pyrena

		Tanpa Surfaktan	Surfaktan Sintetik			Biosurfaktan
			Tween 80	Triton X-100	Brij35	
Mikroorganisme	<i>Spingomonas</i>	Kazunga et al., 2000	Park et al., 2002			
	<i>Mycobacterium</i>	Mahanty et al., 2007 Ramirez et al., 2000 Liang, 2009 Cottin dan Merlin, 2007	Sarma dan Pakshirajan, 2010	Tiehm, 1993	Tiehm, 1993	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Johasz et al., 2000 Boonchan et al., 2000		Boonchan et al., 1998	Boonchan et al., 1998	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					Hwang dan Cutright, 2002
	<i>Agropyron elongatum</i>		Cheng et al., 2008			
	Fungi	Ting et al., 2010 Eibes et al., 2005	Pinto dan Moore, 2000			
	<i>Bacillus sp.</i>	Kazunga et al., 2000 Dan et al., 2006	Bardi et al., 2005			Penelitian yang dilakukan

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian biodegradasi pyrena

Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa pekerjaan utama, yakni:

a. Pembuatan kultur bakteri dalam medium *yeast extract*

Strain bakteri *Bacillus subtilis* C19 yang telah diinokulasi dalam medium agar, selanjutnya dilakukan peremajaan kultur dengan metode gores pada medium 1% (w/v) *yeast extract*. Bakteri yang telah diremajakan selama 24 jam kemudian diambil untuk ditambah sebanyak 2% (v/v) pada prekultur bakteri untuk selanjutnya ditambahkan pada kultur bakteri. Kultur bakteri ini yang kemudian digunakan untuk kultur proses biodegradasi dan produksi biosurfaktan dengan pyrena sintetik 98 % (Sigma Aldrich).

b. Proses biodegradasi pyrena oleh *B. subtilis* C19

Pada bagian ini dilakukan analisis pertumbuhan bakteri dalam kultur biodegradasi dan produksi biosurfaktan. Analisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 600$ nm. Dilakukan juga pembuatan kurva standar pyrena pada

pelarut *n*-heksana untuk digunakan pada analisis konsentrasi pyrena dalam kultur selama biodegradasi (± 28 hari) dengan spektrofotometer UV-Vis.

c. Produksi Biosurfaktan oleh *B. subtilis* C19

Biosurfaktan jenis lipopeptida dihasilkan oleh kebanyakan bakteri *Bacillus*. Bakteri ditumbuhkan pada medium kultur dalam larutan 1 % (w/v) *yeast extract* dan substrat pyrena 100 mg/L selama 28 hari untuk diisolasi produk biosurfaktannya.

d. Isolasi dan uji aktivitas biosurfaktan

Biosurfaktan yang telah diproduksi kemudian diisolasi dengan metode pengendapan asam (Sifour, 2005; Salehizadeh & Mohammadizad, 2009) setelah diuji pertumbuhan bakterinya dalam kultur produksi. Presipitasi menggunakan HCl hingga pH 2 dan ekstraksi kloroform:metanol (2:1, v/v) diharapkan memiliki aktivitas terbaik, baik aktivitas penurunan tegangan permukaan maupun aktivitas emulsinya. Biosurfaktan yang didapat kemudian diuji aktivitasnya terhadap variasi pH dan kelarutannya dalam garam NaCl pada substrat emulsi minyak kerosin.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium, yakni Laboratorium Bioproses Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Penelitian akan dilaksanakan pada awal bulan Februari 2012 sampai dengan bulan Mei 2012 dengan tahapan waktu penelitian sebagai berikut:

Tabel 3. 1 Rencana waktu penelitian biodegradasi pyrena

Kegiatan	Minggu ke-							
	1-2	3	4-5	6-7	8-9	10-11	12-13	14-15
Persiapan alat dan bahan								
Pembuatan Kultur								
Proses biodegradasi								
Produksi biosurfaktan								
Isolasi biosurfaktan								
Uji aktivitas biosurfaktan								
Penulisan hasil dan laporan								

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain:

1. *yeast extract*
2. *Bacillus subtilis* C19
3. Pyrena 98 %
4. HCl 6M
5. NaOH
6. *n*-Heksana
7. Kloroform
8. Metanol

3.3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain:

1. Seperangkat alat *shaker incubator*
2. Seperangkat alat bejana bertekanan
3. Seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis
4. Seperangkat alat MS-FTIR untuk analisa struktur senyawa
5. Seperangkat alat GC-MS untuk analisa senyawa metabolit
6. Seperangkat alat *centrifuge*
7. Indikator universal dan pH meter untuk mengukur pH
8. Gelas ukur, tabung reaksi, labu Erlenmeyer dll.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dibuat bervariasi dengan besar nilai tertentu. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi awal pyrena serta variasi pH dan kadar garam dalam uji aktivitas biosurfaktan.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang terjadi akibat adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah konsentrasi biomassa (X), dan

konsentrasi pyrena (*S*) yang terdegradasi serta persentase emulsifikasi substrat dan larutan biosurfaktan.

3.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat dalam keadaan konstan. Variabel kontrol dari penelitian ini adalah suhu, pH serta rotasi *shaker* selama inkubasi.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Pembuatan Kultur Bakteri *Bacillus subtilis* C19

3.5.1.1 Bakteri

Mikroorganisme : *Bacillus subtilis* C19 dari Laboratorium Bioteknologi LIPI, Cibinong.

3.5.1.2 Peremajaan bakteri dalam *yeast extract*

Bakteri murni *Bacillus subtilis* C19 yang telah dinokulasi, diremajakan kembali dalam media dengan 1% (w/v) *yeast extract* dalam 100 mL aquades yang telah disterilisasi dengan bejana bertekanan selama 15 menit. Biakan bakteri diinkubasi pada suhu 27 °C selama 24 jam pada 90 rpm. Koloni yang tumbuh dengan baik digunakan sebagai stok bakteri selama penelitian untuk selanjutnya ditanam ke media prekultur bakteri.

3.5.1.3 Pembuatan prekultur bakteri

Ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml yang berisi 100 mL aquades ditambahkan 1% (w/v) substrat *yeast extract* dan substrat pyrena 100 mg/L. Larutan dihomogenkan dan diukur pH-nya. Media disterilkan dengan bejana bertekanan selama 15 menit. Ke dalam labu Erlenmeyer ditambahkan 2% (v/v) bakteri dari tahapan peremajaan. Prekultur bakteri diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 27 °C , 90 rpm.

3.5.1.4 Pembuatan kultur bakteri

Ke dalam Erlenmeyer berukuran 250 ml diisi dengan 100 ml aquades dan 1% (w/v) substrat *yeast extract* dan substrat pyrena (kultur biodegradasi dan kultur produksi biosurfaktan). Larutan dihomogenkan dengan menggunakan magnetik stirer. Media disterilkan dengan bejana bertekanan selama 15 menit. Ke dalam masing-masing kultur ditambahkan 2 % kultur bakteri (v/v) dari media

prekultur bakteri yang memiliki nilai OD = 0,9 pada λ_{600} . Prekultur bakteri dengan nilai OD > 0,9 diencerkan dengan 1% substrat *yeast extract* hingga mencapai OD=0,9. Kultur bakteri diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 27 °C, 90 rpm, dan waktu inkubasi selama \pm 28 hari.

3.5.2 Proses Biodegradasi Pyrena

3.5.2.1 Pertumbuhan bakteri dalam kultur biodegradasi

Masing-masing sampel yang telah disiapkan untuk pengujian selama proses biodegradasi (28 hari) kemudian dilihat pertumbuhan selnya dalam media kultur dari absorbansi pada $\lambda = 600$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Dengan demikian, didapatkan grafik pertumbuhan bakteri kultur *B. subtilis* C19 dalam kultur biodegradasi pyrena. Selain itu, dapat dibuat juga kinetika pertumbuhan sel bakteri untuk melihat laju pertumbuhan spesifik pada masing-masing konsentrasi.

3.5.2.2 Perubahan konsentrasi pyrena dalam kultur biodegradasi

Selain dilihat absorbansi pertumbuhan sel bakteri dalam kultur, juga dilakukan analisis konsentrasi pyrena dalam kultur biodegradasi. Uji dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang absorbansi pyrena yang telah dibuat kurva standarnya sebelumnya. Kurva standar dibuat dengan melarutkan pyrena konsentrasi 100-1000 mg/L pada pelarut *n*-heksana. Panjang gelombang dengan koefisien korelasi (R^2) terbaik dipilih sebagai kurva standar konsentrasi-absorbansi.

3.5.2.3 Analisis metabolit biodegradasi

Analisa metabolit biodegradasi pyrene oleh *B. subtilis* C19 dengan menggunakan spektrometer GC – MS. Sampel diasamkan dengan HCl pada pH 2 kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan solven klorofom:methanol (2:1) (Mallick et al., 2007), kemudian dilakukan analisa dengan spektrometer GC-MS.

Penentuan berat molekul suatu senyawa dan analisis fragmentasi spesifik senyawa membutuhkan sampel sebanyak 1 mg yang dimasukkan dalam tabung kapiler kemudian ditembak dengan penembak elektron 70 eV. Hasil penembakan direkam pada m/e 0 – 300 dan akan diketahui pola fragmentasi senyawa yang akan dianalisis.

Analisa GC – MS ini dilakukan dengan menggunakan kolom BD 5 dalam kromatografi gas (GC), kolom kapiler dengan ukuran 30 m x 0,02 mm, film thickness 0,32 μm), dengan temperatur diprogram dari 60 °C – 300 °C dengan kenaikan 8 °C permenit. Setelah suhu mencapai 300 °C sistem operasi dilakukan secara isothermal sampai seluruh peak terelusi seluruhnya

3.5.3 Produksi dan Isolasi Biosurfaktan

Selain dikhususkan untuk memproduksi biosurfaktan, kultur ini juga dilihat fase pertumbuhan bakterinya ($\lambda = 600 \text{ nm}$) setiap dua hari selama 28 hari. Sedangkan isolasi biosurfaktannya dilakukan pada akhir fase stasioner pertumbuhan bakteri. Sel bakteri dipisahkan dari medium yang mengandung biosurfaktan dengan sentrifugasi pada 9000 rpm, selama 15 menit. Biosurfaktan diisolasi dari supernatan kultur dengan cara pengendapan menggunakan HCl 6 M hingga pH 2 (kadar tinggi untuk mengurangi aktivitas air sehingga senyawa aktif permukaan yang semula larut dalam air akan terendapkan), kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan presipitasi pada 15000 rpm selama 15 menit. Presipitat dipisahkan dan ditambahkan kloroform:metanol (2:1,v/v) untuk mendapatkan ekstrak biosurfaktan. Selanjutnya pelarut diuapkan untuk mendapatkan crude biosurfaktan untuk selanjutnya dianalisis dengan GC-MS/FTIR. Efektifitas biosurfaktan diketahui dari hasil proses biodegradasi terhadap pyrena yang akan dilakukan serta beberapa uji seperti uji emulsifikasi, uji pH, dan uji garam (NaCl) terhadap beberapa jenis minyak; minyak nabati, kerosene, dan pelumas.

Dalam karakterisasi biosurfaktan, sampel sebanyak 1 miligram dicampur dengan 10–100 miligram KBr dalam kondisi tanpa air dan dibuat pelet dengan menggunakan cetakan. Pellet KBr tersebut diukur vibrasinya dan dilihat hasil spektrumnya pada panjang gelombang 4000-667 cm^{-1} (Harbone, 1987).

3.5.4 Uji Aktivitas Biosurfaktan

3.5.4.1 Pengukuran Indeks Emulsifikasi

Biosurfaktan dalam supernatan kultur dipisahkan dari sel bakteri dengan sentrifugasi 13.000 rpm. Selanjutnya biosurfaktan dicampur dengan minyak dengan perbandingan 1:1 dan diagitasi selama 1 menit lalu didiamkan selama 24 jam. Indeks emulsifikasi diukur dengan membandingkan tinggi kolom *crude oil* yang teremulsi terhadap tinggi total dikalikan 100 (Helmy et al., 2010)

3.5.4.2 Pengukuran Stabilitas Emulsi

Salah satu karakteristik penting biosurfaktan adalah efektivitasnya dalam emulsifikasi pada beberapa rentang pH, suhu dan salinitas (Banat et al., 2000). Bioemulsifier yang diproduksi oleh *B. subtilis* C19 juga diujikan pada beberapa variasi tersebut. Digunakan minyak kerosin sebagai substrat dan konsentrasi 0.2 % (w/v) *crude biosurfactant* pada 100 mL aquades sebagai larutan.

a Pengaruh pH terhadap stabilitas emulsi

Sebanyak 4 ml larutan yang telah divariasikan pH (3, 5, 7, 9, dan 12) (Helmy et al., 2010; Velasco et al., 2006) dicampurkan dengan substrat minyak (1:1, v/v) kemudian divorteks selama 1 menit, dan didiamkan selama 24 jam untuk selanjutnya diukur aktivitas emulsinya.

b Pengaruh kadar garam NaCl terhadap stabilitas emulsi

Sebanyak 4 ml larutan yang telah divariasikan kadar garam NaCl (0 %, 5%, 10%, 15%, dan 20%) (Velasco et al., 2006) dicampurkan dengan substrat minyak (1:1, v/v) kemudian divorteks selama 1 menit, dan didiamkan selama 24 jam untuk selanjutnya diukur aktivitas emulsinya

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Bakteri *Bacillus subtilis* C19

4.1.1 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan untuk mengaktifkan kembali bakteri yang telah diinokulasi sebelumnya dalam media agar. Medium *yeast extract* 1 % (w/v) (1 gr/100 mL aquades), yang telah disterilkan sebelumnya dengan bejana bertekanan selama 15 menit, digunakan sebagai sumber makanan bakteri selama peremajaan. Perlu diperhatikan dalam menginkubasi bakteri adalah rotasi shaker untuk meningkatkan aerasi (transfer oksigen) pada interfisial bakteri yang bekerja pada kondisi aerob, serta suhu ruang yang berpengaruh pada bioavailabilitas bakteri.



Gambar 4. 1 Peremajaan bakteri *Bacillus subtilis* C19

4.1.2 Prekultur Bakteri

Prekultur merupakan tahapan lanjut sebelum biakan bakteri digunakan dalam kultur biodegradasi dan kultur produksi biosurfaktan. Selain digunakan medium 1% (w/v) *yeast extract* sebagai sumber makanan, digunakan pula 100 mg/L pyrena sebagai sumber karbon dalam metabolisme sbakteri (Romero et al., 2002; Eibes et al., 2005; Ting et al., 2011). Sebanyak 2% (v/v) bakteri dari tahap

peremajaan ditambahkan ke dalam prekultur. Prekultur bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27 °C dan 90 rpm, selanjutnya dicek OD nya pada $\lambda = 600 \text{ nm}$ sebelum ditambahkan ke dalam kultur. Nilai absorbansi memberikan besarnya OD (*optical density*) yang menunjukkan besarnya konsentrasi sel (biomassa) yang tumbuh dalam medium. Satuan absorbansi ($\lambda_{600\text{nm}}$) ini sebanding dengan besarnya konsentrasi sel (X) dalam g/L basis kering (Juang dan Tsai. 2006).

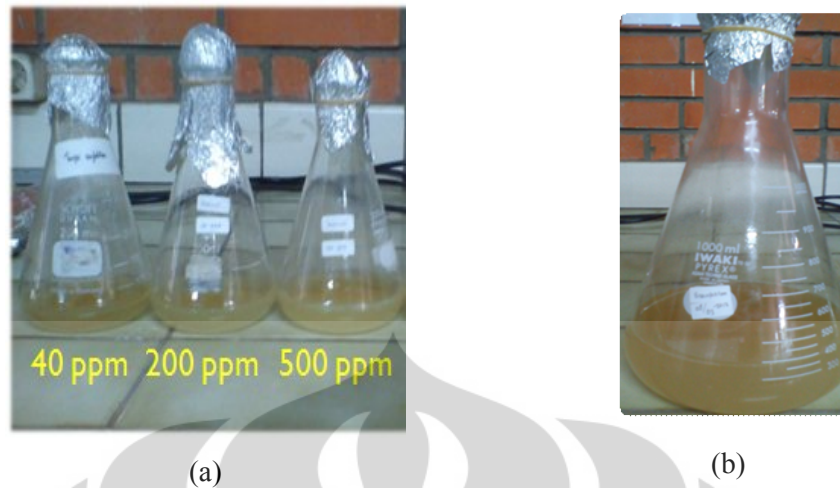


Gambar 4. 2 Prekultur bakteri *Bacillus subtilis* C19

4.1.3 Kultur Bakteri

Prekultur yang telah dicek OD nya selanjutnya digunakan sebagai biakan dalam kultur. Diketahui dari analisis dengan spektrofotometer UV-Vis, OD dari tahapan prekultur adalah sebesar 2.38, sehingga bakteri yang digunakan untuk tahapan kultur adalah sebanyak 1% (v/v).

Dibuat dua kultur bakteri, yakni kultur biodegradasi (40, 200 dan 500 mg/L pyrena) dan kultur untuk produksi biosurfaktan (100 mg/L pyrena) masing-masing di dalam larutan 1% (w/v) *yeast extract*. Kultur bakteri diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 27 °C, 90 rpm, dan waktu inkubasi selama ± 28 hari. Baik itu kultur biodegradasi dan kultur produksi biosurfaktan dilakukan pengecekan OD ($\lambda_{600\text{nm}}$) sebagai data konsentrasi sel (X) setiap dua hari. Sedangkan untuk mengetahui proses biodegradasi pyrena oleh *B. subtilis* C19, dilakukan pengecekan konsentrasi pyrena dalam kultur setiap dua hari dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang $\lambda = 348 \text{ nm}$. (subbab 4.2.2)

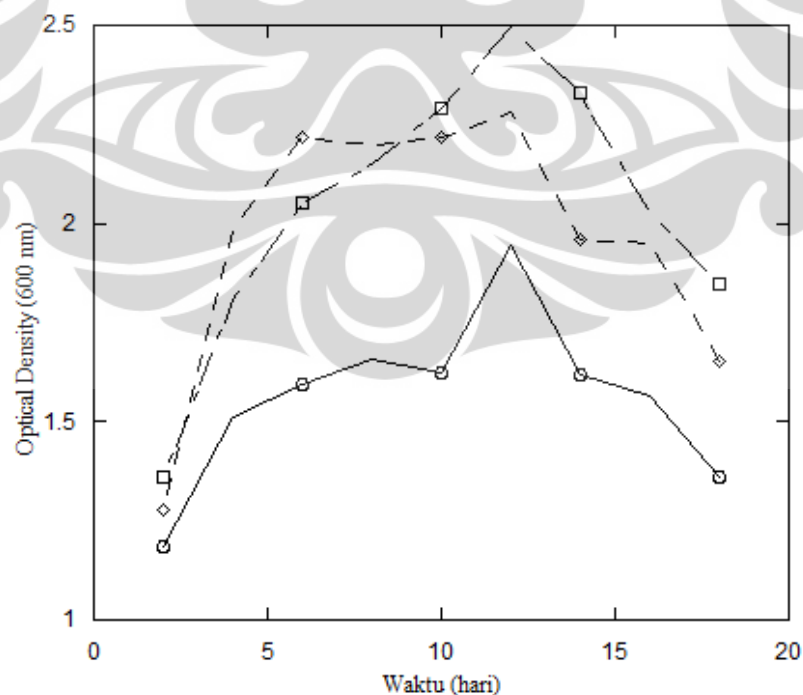


Gambar 4. 3 Kultur bakteri. (a) biodegradasi, (b) produksi biosurfaktan

4.2 Biodegradasi Pyrena

4.2.1 Pertumbuhan Bakteri dalam Kultur Biodegradasi

Kemampuan *Bacillus subtilis* tumbuh dalam media yang mengandung pyrene telah dilaporkan juga oleh Toledo et al., (2008) serta Das dan Mukherjee (2006). *B. subtilis* C19 merupakan *marine bacteria* yang mampu tumbuh pada substrat pyrena dan menjadikannya sebagai sumber karbon. Kurva pertumbuhan *B. subtilis* C19 pada beberapa konsentrasi pyrena ditampilkan pada gambar 4.4 berikut :



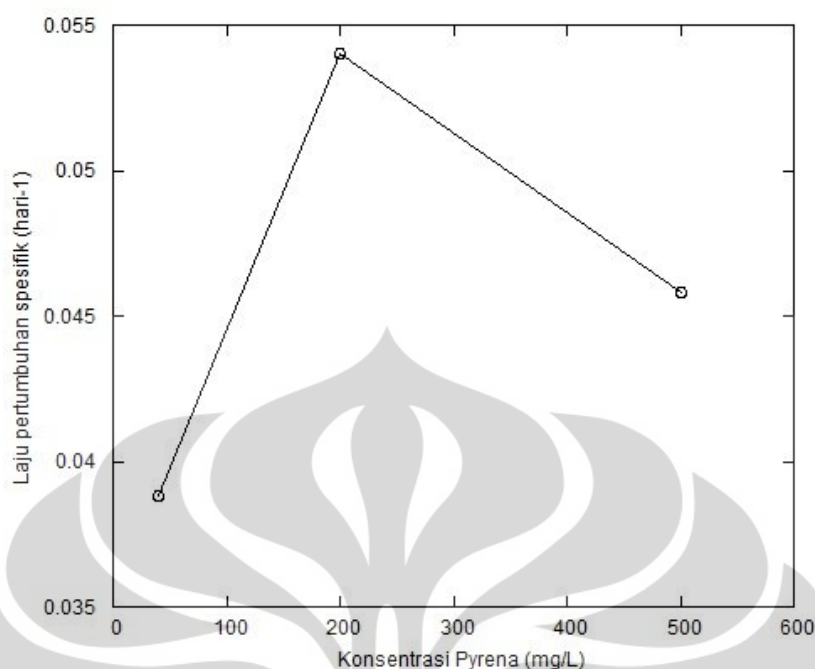
Gambar 4. 4 Kurva pertumbuhan *B. subtilis* C19 kultur biodegradasi (○) 40 mg/L, (□) 200 mg/L dan (◇) 500 mg/L

Dari kurva pertumbuhan di atas, terlihat bahwa pertumbuhan bakteri mencapai fase eksponensial atau tepat di awal fase stasioner adalah pada hari ke-12. Setelah fase tersebut, lingkungan kultur cenderung toksik dan menyebabkan kematian pada bakteri. Fase eksponensial pertumbuhan bakteri digunakan dalam menentukan laju pertumbuhan sel spesifik (μ) pada masing-masing konsentrasi, sehingga diketahui konsentrasi maksimum substrat yang terlarut dalam medium kultur (Gokulakrishnan et al., 2005).

Tabel 4. 1 OD bakteri kultur biodegradasi pada fase eksponensial

Waktu (hari)	OD rata-rata (fase eksponensial)		
	40 mg/L	200 mg/L	500 mg/L
2	1.187	1.362	1.280
4	1.513	1.807	1.988
6	1.593	2.050	2.220
8	1.656	2.150	2.197
10	1.622	2.290	2.220
12	1.943	2.493	2.280
Laju pertumbuhan spesifik μ (hari ⁻¹)	0.038	0.054	0.045

Dengan melakukan plot $\ln(X/X_0)$ vs t (hari), seperti pada persamaan (2.5), didapatkan slope selama fase eksponensial pertumbuhan bakteri yang memberikan laju pertumbuhan spesifik bakteri (μ) (Sgountzos et al., 2006). Dengan menggunakan data tersebut pada masing-masing konsentrasi awal substrat pyrena (gambar 4.5) didapatkan konsentrasi maksimum pyrena yang memberikan peningkatan pertumbuhan sel selama proses biodegradasi.



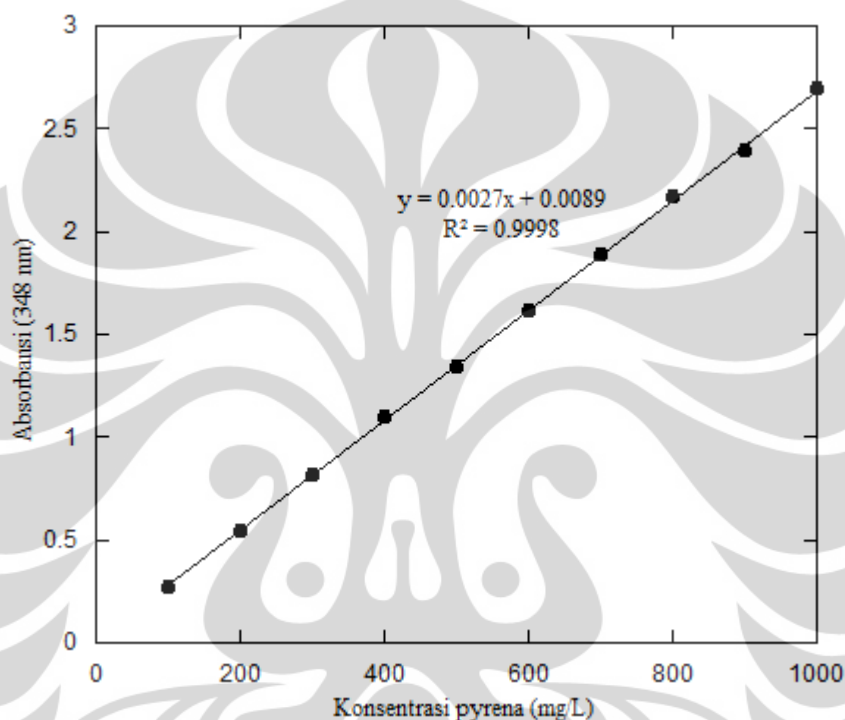
Gambar 4. 5 Grafik laju pertumbuhan spesifik pada beberapa konsentrasi pyrena

Pertumbuhan sel (X) meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat awal hingga 200 mg/L. Di sisi lain, dengan peningkatan konsentrasi substrat (S) yang lebih besar dari 200 mg/L pertumbuhan sel menurun hingga pada konsentrasi substrat sebesar 500 mg/L. Jika substrat menghambat pertumbuhan mikroba (inhibisi) pada konsentrasi substrat yang tinggi, terdapat konsentrasi kritis dimana laju pertumbuhan spesifik mikroorganisme menurun dengan peningkatan konsentrasi substrat (Gokulakrishnan et al., 2005). Dengan demikian, konsentrasi kritis pada proses biodegradasi pyrena adalah pada konsentrasi 200 mg/L.

Fase adaptasi diperlukan pada awal pertumbuhan (24 jam) untuk meningkatkan kelarutan sumber karbon pyrena dalam medium pertumbuhan, dan fase stasioner dimulai setelah 12 hari pertumbuhan hingga hari seterusnya sampai di fase kematian bakteri. Faktor yang merupakan penentu kecepatan pertumbuhan sel adalah *bioavailability* dari substrat pyrena yang bersifat hidrofobik. Bioavailabilitas dari substrat pyrena ditingkatkan dengan produksi bioemulsifier oleh strain *B. subtilis* C19 ini, sehingga kecepatan pertumbuhan dipengaruhi oleh kecepatan produksi bioemulsifier.

4.2.2 Perubahan Konsentrasi Pyrena dalam Kultur

Kecepatan biodegradasi PAHs pyrena dipengaruhi oleh kelarutan sumber karbon pyrena dalam media pertumbuhannya. Untuk mengetahui konsentrasi pyrena yang terdegradasi selama inkubasi, perlu dibuat kurva standar dengan larutan *blanko* yakni pelarut *n*-heksana. Dengan koefisien korelasi paling baik ($R^2=0.9998$), absorbansi konsentrasi pyrena terdeteksi pada panjang gelombang $\lambda=348$ nm.



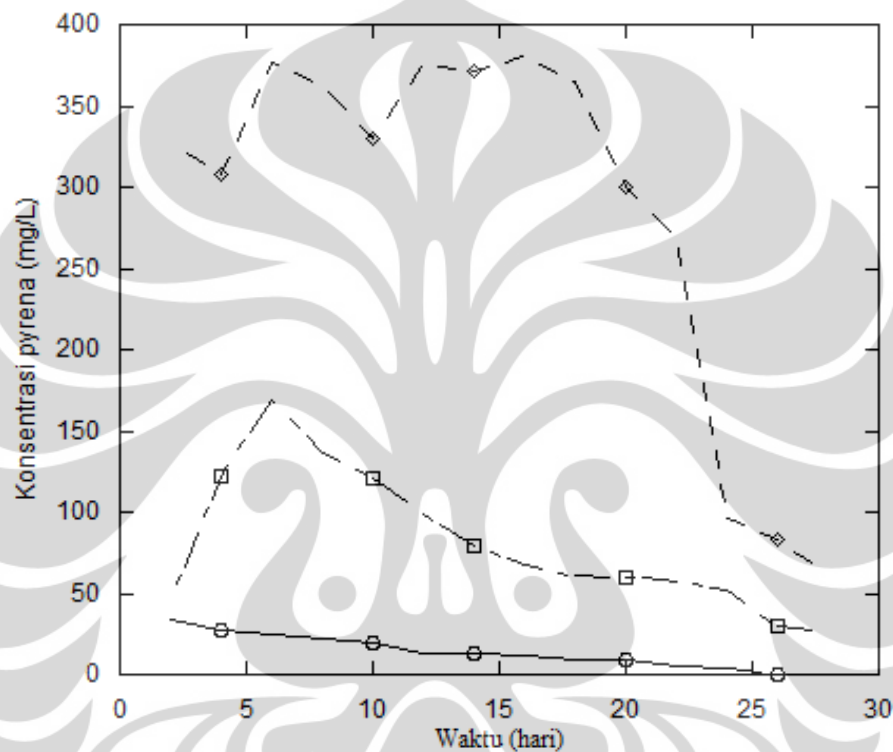
Gambar 4. 6 Kurva standar pyrena pada *n*-heksana

Profil biodegradasi senyawa pyrena sebagai sumber karbon tunggal dalam medium pertumbuhan oleh *B. subtilis* C19 pada beberapa variasi konsentrasi ditunjukkan oleh gambar 4.7 berikut :

Tabel 4. 2 Data konsentrasi pyrena dari kultur biodegradasi

t (hari)	Konsentrasi pyrena (mg/L)		
	40	200	500
2	34.11	46.15	327.86
4	27.44	121.70	308.17
6	25.22	168.93	376.49
8	21.70	136.70	362.28
10	19.48	121.15	329.74
12	13.56	98.37	375.12
14	12.82	79.48	371.70

16	11.89	67.82	380.09
18	8.56	61.70	364.85
20	8.56	59.48	300.46
22	5.41	57.82	268.27
24	4.48	51.70	95.84
26	0.41	30.04	83.00
28	0.04	25.59	61.76



Gambar 4. 7 Profil biodegradasi pyrena oleh *Bacillus subtilis* C19 (○) 40 mg/L, (□) 200 mg/L dan (◇) 500 mg/L

Grafik di atas memberikan profil konsentrasi pyrena pada masing-masing kultur biodegradasi (40, 200, 500 mg/L). Terlihat bahwa pada konsentrasi 40 mg/L, selalu terjadi penurunan konsentrasi pyrena dari hari ke hari. Sedangkan pada konsentrasi 200 mg/L, terjadi fase solubilisasi pada fase awal inkubasi pyrena (hari ke-6), hingga selanjutnya fase reduksi pyrena sampai hari ke-28. Sedangkan pada konsentrasi 500 mg/L, fase reduksi bahkan baru dimulai pada hari ke-16 inkubasi.

Kelarutan pyrena yang sangat kecil pada konsentrasi pyrena yang sangat tinggi dalam media pertumbuhan bakteri ini linier terhadap hasil pada fase pertumbuhan bakteri (gambar 4.5) yang digambarkan dari laju pertumbuhan sel

spesifik pada masing-masing konsentrasi. Bahwa pada konsentrasi pyrena yang lebih besar dari 200 mg/L, terjadi penurunan laju pertumbuhan bakteri yang juga menurunkan tingkat konsumsi substrat pyrena selama inkubasi. Hal ini juga lah yang mempengaruhi tingkat kelarutan substrat pada konsentrasi tersebut, dikarenakan produksi bioemulsifier oleh bakteri yang cukup lama pada konsentrasi biomassa yang cukup kecil (gambar 4.4).

Secara garis besar proses biodegradasi pyrena menjadi intermediet phenantrene dibagi menjadi 2 tahap yaitu :

- a. Pelarutan pyrena dan pembentukan intermediet phenanthrene (reduksi pyrena)

Tahap ini berlangsung pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-6 inkubasi (200 mg/L), dan hari ke-16 (500 mg/L). Pada tahap ini kecepatan pelarutan pyrene lebih besar dari pada konversi pyrene menjadi intermediet *phenanthrene*.

- b. Biodegradasi pyrena dan biodegradasi phenantrene.

Tahap ini dimulai dari hari ke-6 (200 mg/L) dan hari ke-16 (500 mg/L) sampai dengan hari ke-28 inkubasi, pada tahap ini berlangsung proses biodegradasi pyrene menjadi *phenanthrene*, dan proses biodegradasi phenanthrene menjadi metabolit lain yang lebih sederhana. Kemampuan bakteri *Bacillus subtilis* dalam mereduksi phenantrene telah dilakukan oleh Bardi et al., (2005), dengan *phenanthrene removal* sebesar 50 %.

Berkaitan dengan kinetika reaksi pada biodegradasi pyrena oleh *B. subtilis* C19, pendekatan kinetika orde satu pada degradasi pyrena (Eibes et al., 2005; Ting et al., 2011; Dan et al., 2006) tidak dapat dilakukan. Hal ini dikarenakan adanya inhibis substrat dalam proses biodegradasi pada konsentrasi yang tinggi. Oleh karena itu dilakukan pendekatan beberapa persamaan kinetik dalam melakukan estimasi parameter kinetik pada berbagai model inhibisi substrat (tabel 2.5).

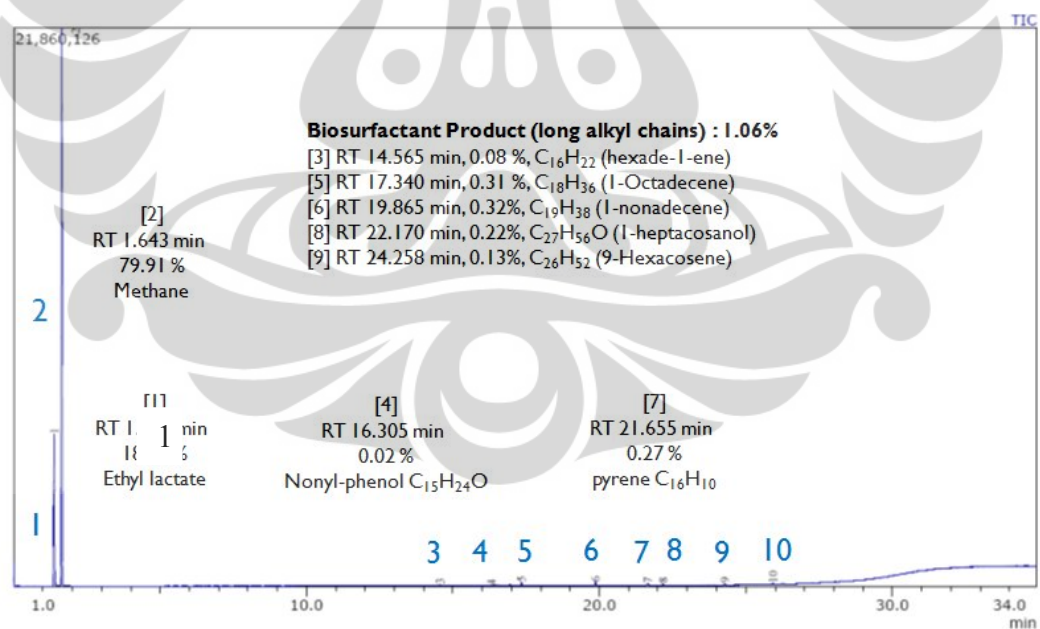
Pathways biodegradasi senyawa aromatis oleh bakteri dilaporkan Seo et al., (2009) dalam biodegradasi satu molekul pyrene dihasilkan 7 senyawa intermediet, 6 diantaranya merupakan *derivate* phenanthrene, dan 1 intermediet

biodegradasi dalam bentuk *phthalic acid*.

Pada tahap awal inkubasi konsentrasi pyrena terlarut dalam media pertumbuhan meningkat seiring dengan dihasilkannya biosurfaktan oleh *B. subtilis* C19. Seperti halnya yang ditunjukkan pada profil konsentrasi pyrena (gambar 4.7) serta profil laju pertumbuhan spesifik (gambar 4.5) pada masing-masing konsentrasi awal, terlihat bahwa konsentrasi dengan kelarutan yang paling baik adalah pada konsentrasi 200 mg/L. Pada konsentrasi 500 terlihat bahwa kelarutan pyrena dalam medium sangat kecil dan menyebabkan inhibisi pada pertumbuhan biomasnya. Pada tahap lebih lanjut, pyrena terdegradasi menjadi bentuk intermediat lain yang lebih sederhana dan masuk dalam siklus kreb untuk degradasi sempurna.

4.2.3 Analisis Metabolit Biodegradasi

Analisa metabolit biodegradasi pyrene dilakukan setelah 25 hari inkubasi, metode isolasi metabolit yang dilakukan adalah modifikasi dari metode yang dipublikasikan oleh Mallick et al., (2007). Hasil analisa GC-MS komposisi senyawa metabolit ditunjukkan oleh gambar 4.8 dan tabel 4.3 berikut :



Gambar 4. 8 Kromatogram GC metabolit biodegradasi pyrene oleh *Bacillus subtilis* C19

Tabel 4. 3 Report MS dari kromatogram GC

Peak	Waktu Retensi	% Area	Metabolite
1	1.387	18.63	Ethanol
2	1.643	79.91	Kloroform (Solven)
3	14.564	0.08	C ₁₆ H ₃₂ (1-hexadecane)
4	16.305	0.02	Phenol,4,4'-(1,2-diethylen)di-,meso- C ₁₈ H ₂₂ O ₂
5	17.343	0.31	C ₁₈ H ₂₂ O ₂ (1-Octadecene)
6	19.866	0.32	C ₁₉ H ₄₀ O (1-nonadecanol)
7	21.657	0.27	C ₁₆ H ₁₀ (Pyrene)
8	22.169	0.22	C ₂₇ H ₅₆ O (1-heptacosanol)
9	24.286	0.13	C ₂₇ H ₅₆ O (1-heptacosanol)
10	25.925	0.11	1,2 Benzendicarboxylic acid C ₂₄ H ₃₈ O ₄

Dari hasil analisa GC-MS pada gambar 4.8 dan tabel 4.3 tersebut diatas, diketahui prosentase metabolit biodegradasi pyrena oleh *Bacillus subtilis* C19 adalah sebagai berikut:

Tabel 4. 4 Persentase metabolit biodegradasi pyrena oleh *B. subtilis* C19

Produk metabolit	Persentase (%)	Keterangan
Produk metabolit non-toxic	91,82 %	Ethanol 91.82%
Biosurfaktan	5,22 %	C ₁₆ H ₃₂ (1-hexadecene), 0.38%, C ₁₈ H ₂₂ O ₂ (1-Octadecene), 1.53 %, C ₁₉ H ₄₀ O (1-nonadecanol) , 1.58 %, C ₂₇ H ₅₆ O (1-heptacosanol), 1.72%
Produk metabolit aromatic	2,96 %	1,2 Benzendicarboxylic acid, 0.54 % Phenol,4,4'-(1,2-diethylen)di-,meso-, 1.08% Pyrene 1.33 %

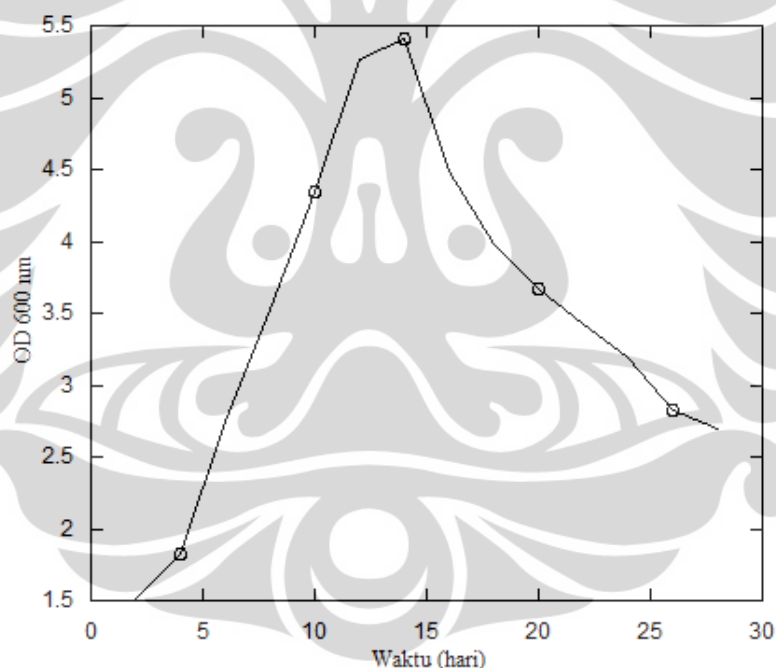
Biodegradasi pyrena oleh *B. subtilis* C19 menghasilkan 5,22 % produk bioemulsifier, bioemulsifier ini berperan dalam meningkatkan bioavaibilitas saubstrat pyrena, 91,82 % metabolit merupakan senyawa intermediet yang bersifat

non-toxic. Sementara 2,96 % metabolit masih dalam bentuk senyawa aromatis pada 25 hari inkubasi, namun demikian setelah lebih dari 24 hari inkubasi seluruh pyrene telah terdegradasi sempurna dan terkonversi menjadi senyawa yang bersifat non-toxic.

4.3 Biosurfaktan *Bacillus subtilis* C19

4.3.1 Pertumbuhan Bakteri dalam Kultur Produksi Biosurfaktan

Karakteristik pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* C19 dalam kultur produksi biosurfaktan dapat dilihat pada gambar 4.9. Biosurfaktan mulai diproduksi pada awal fase stasioner pertumbuhan sel sebagai bagian metabolit sekunder metabolisme bakteri (Velasco et al., 2006). Jika dilihat pada gambar maka dapat dikatakan bahwa biosurfaktan mulai diproduksi pada hari ke-12, hingga diisolasi pada hari ke-14.



Gambar 4. 9 Kurva pertumbuhan bakteri *B. subtilis* C19 pada kultur produksi biosurfaktan

4.3.2 Produksi Biosurfaktan

Bacillus subtilis C19 memiliki potensi untuk menghasilkan bioemulsifier ketika ditumbuhkan pada substrat poliaromatik hidrokarbon (PAHs) termasuk pyrena, bioemulsifier ini mulai dihasilkan pada awal fase awal (hari-12) sampai dengan akhir fase stasioner (hari-14). Hasil serupa juga telah dilaporkan, dimana

sekresi biosurfaktan oleh *B. subtilis* DM4 dan *Pseudomonas aeruginosa* strain M, NM juga dimulai pada 24 jam pertumbuhan (Das dan Mukherjee, 2007).

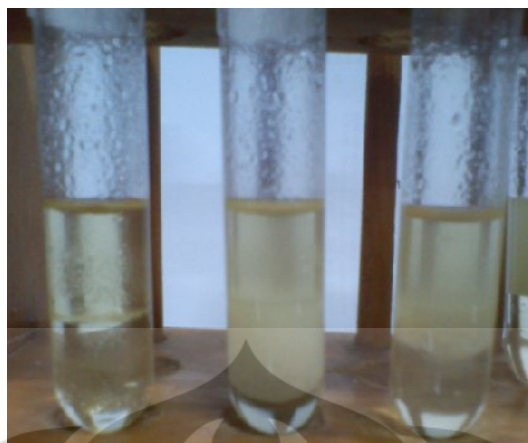
Melihat kurva pertumbuhan bakteri pada kultur produksi biosurfaktan (gambar 4.9), bahwa biosurfaktan mulai diproduksi pada hari ke-12 (fasa stasioner), sehingga dilakukan aktivitas bioemulsifier pada hari tersebut. Produksi bioemulsifier dianalisa dengan uji emulsifikasi pada berbagai minyak uji, termasuk juga pengujian dengan surfaktan sintetik Tween 80 pada konsentrasi misel kritisnya (CMC = 15 mg/L), serta dengan larutan *blanko* (1 %, w/v, *yeast extract*).



Gambar 4. 10 Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur pada hari ke 12 inkubasi (variasi minyak nabati)



Gambar 4. 11 Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur pada hari ke 12 inkubasi (variasi minyak pelumas/oli)



yeast extract 1 % Tween 80 (CMC = 15 ppm) Biosurfaktan (hari - 12)

Gambar 4. 12 Aktivitas emulsifikasi supernatan kultur pada hari ke 12 inkubasi (variasi minyak kerosene)

Aktivitas emulsifikasi dari supernatan kultur pada hari ke-12 dibandingkan dengan surfaktan sintetik tween 80 pada konsentrasi CMC (15 mg/L) serta *blanko* 1% (w/v) *yeast extract* pada tabel berikut:

Tabel 4. 5 Aktivitas emulsifikasi (E_{24}) biosurfaktan, surfaktan Tween 80 dan *blanko* 1% *yeast extract*

Surfaktan \ Minyak uji	Nabati	Oli	Kerosene
	Yeast extract 1%	53.84 %	54.55 %
Tween 80 (CMC = 15 ppm)	68.48 %	56.44 %	53.27 %
Biosurfaktan (hari - 12)	73.29 %	58.93 %	35.99 %

4.3.3 Isolasi dan Karakterisasi Biosurfaktan

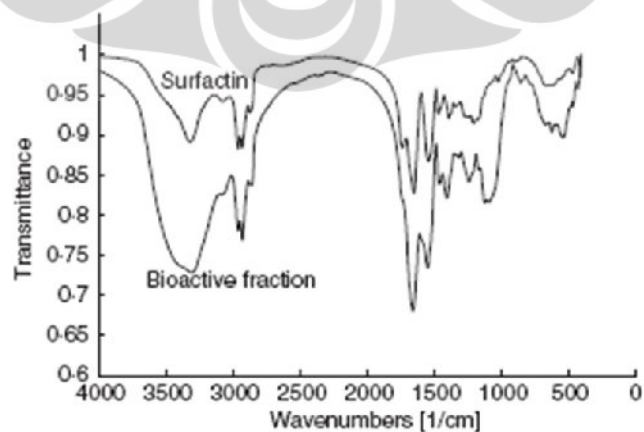
Isolasi biosurfaktan telah dilakukan dengan metode pengendapan asam (Salehizadeh & Mohammadizad, 2009; dan Sifour ,2005), dihasilkan senyawa biosurfaktan berwarna putih kekuningan. Sel bakteri dipisahkan dari medium yang mengandung biosurfaktan dengan sentrifugasi pada 9000 rpm, selama 15 menit. Biosurfaktan diisolasi dari supernatan kultur dengan cara pengendapan

menggunakan HCl 6 M hingga pH 2. Hal ini dilakukan karena pada kadar keasaman yang tinggi aktivitas air berkurang sehingga senyawa aktif permukaan yang semula larut dalam air akan terendapkan. Supernatan yang telah ditambahkan HCl (pH 2) didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan presipitasi pada 15000 rpm selama 15 menit. Presipitat dipisahkan dan ditambahkan kloroform:metanol (2:1,v/v) untuk mendapatkan ekstrak *crude biosurfactant*.



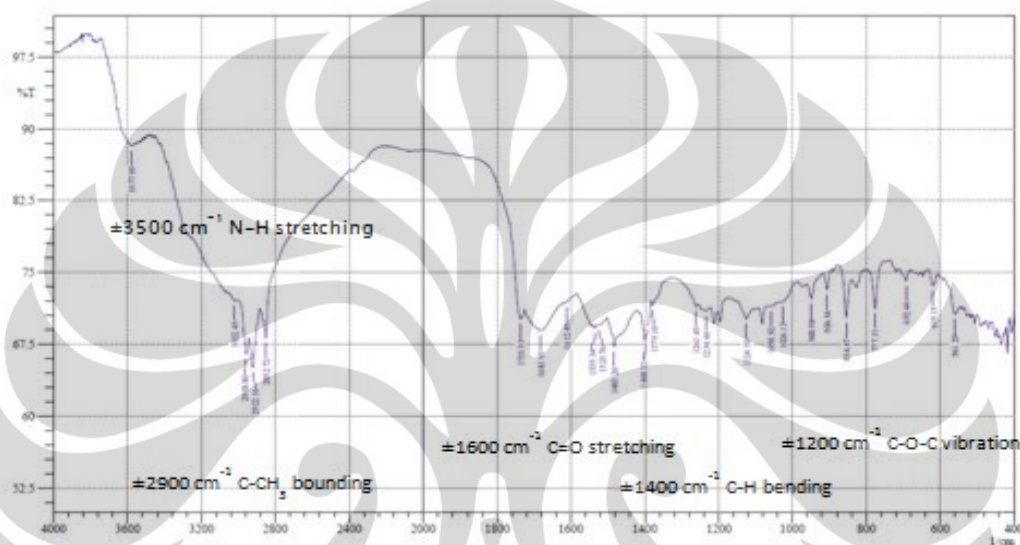
Gambar 4. 13 *Crude biosurfactant Bacillus subtilis C19*

Produksi biosurfaktan dilakukan pada hari ke-14 inkubasi dikarenakan fasa stasioner pertumbuhan bakteri berlangsung sampai hari ke-14. Metabolit sekunder pada mikroorganisme diketahui dihasilkan pada fasa tersebut dan dalam hal ini metabolit *B. subtilis* C19 dengan substrat pyrena adalah dalam bentuk bioemulsifier jenis surfaktin (gambar 4.15).



Gambar 4. 14 Spektrum FTIR standar surfaktin (Sigma Chemicals)

Karakterisasi gugus fungsi biosurfaktan dengan menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infrared*) spektrometri, diketahui jenis senyawa bioemulsifier yang dihasilkan oleh *B. subtilis* C19 tergolong dalam kelompok lipopeptida jenis surfaktin (surfaktin standar gambar 4.14). Gambar berikut menunjukkan spektrum FTIR dari produk biosurfaktan (*B. subtilis* C19) setelah diisolasi dengan pengendapan asam dan dilanjutkan dengan ekstraksi dengan menggunakan pelarut kloroform : metanol dengan perbandingan 2:1 (v/v).



Gambar 4. 15 Spektrum FTIR biosurfaktan *Bacillus subtilis* C19

Peak pada $\pm 3500 \text{ cm}^{-1}$ berasal *N-H stretching vibration* yang mengindikasikan keberadaan gugus fungsi amino dari peptida, *peak* pada $\pm 2900 \text{ cm}^{-1}$ berasal dari vibrasi ikatan C-CH₃ yang mengindikasikan adanya gugus alkil rantai panjang dari biosurfaktan. *Peak* pada $\pm 1600 \text{ cm}^{-1}$ berasal dari vibrasi C=O *stretching*, *peak* pada $\pm 1400 \text{ cm}^{-1}$ dari vibrasi ikatan C-H, dan *peak* pada $\pm 1200 \text{ cm}^{-1}$ berasal dari vibrasi ikatan C-O-C dari ikatan metil ester lipopeptida biosurfaktan. Hasil serupa juga telah dilaporkan oleh Das et al., (2008), dimana *Bacillus subtilis* DM4 menghasilkan bioemulsifier dengan jenis senyawa lipopeptida.

4.4 Uji Aktivitas Biosurfaktan

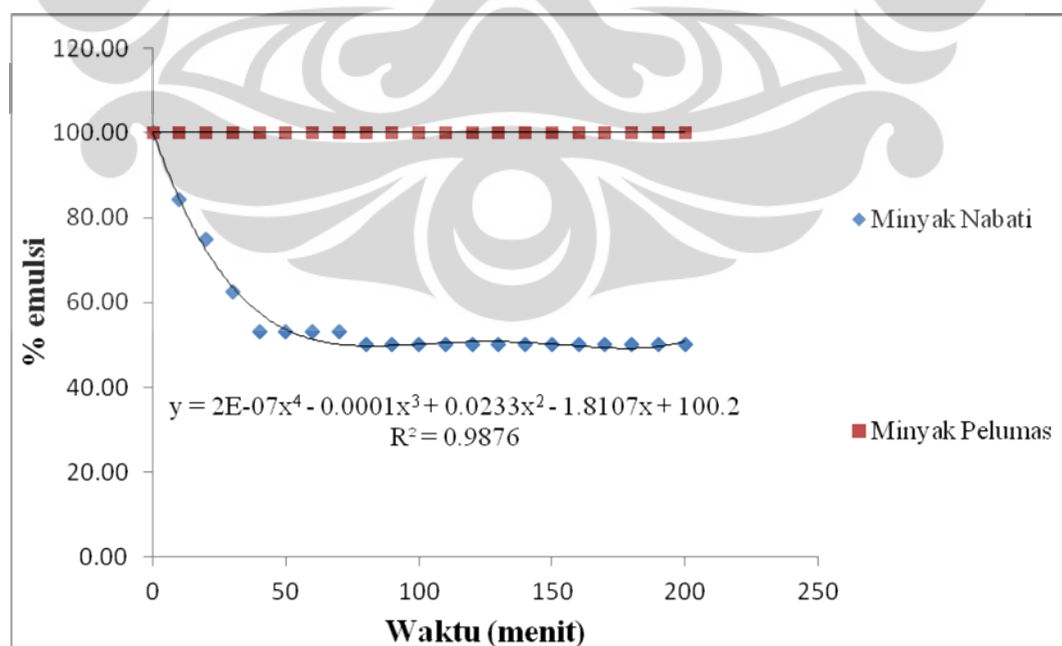
4.4.1 Pengukuran Indeks Emulsifikasi

Kultur produksi biosurfaktan diambil supernatannya dengan sentrifugasi 13.000 rpm untuk memisahkan sel bakteri. Selanjutnya supernatan dicampur

dengan minyak dengan perbandingan 1:1 dan divortex selama 1 menit lalu didiamkan selama 24 jam. Indeks emulsifikasi diukur dengan membandingkan tinggi kolom *crude oil* yang teremulsi terhadap tinggi total dikalikan 100 (Helmy et al., 2010). Berikut aktivitas emulsifikasi biosurfaktan pada minyak nabati (Bimoli) dan pelumas (Castrol Oil)



Gambar 4. 16 Emulsifikasi biosurfaktan pada minyak nabati (Bimoli) dan pelumas (Castrol Oil)



Gambar 4. 17 Indeks emulsifikasi biosurfaktan pada minyak nabati dan pelumas

Dari gambar 4.17, didapatkan aktivitas emulsifikasi biosurfaktan *B. subtilis* C19 (1mg/10mL) rata-rata baik itu pada minyak nabati dan minyak pelumas masing-masing adalah sebesar 50 dan 100 %.

4.4.2 Pengukuran Stabilitas Emulsi

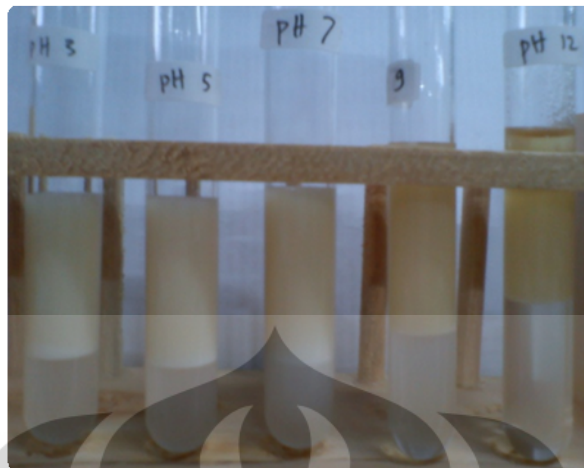
Salah satu karakteristik penting biosurfaktan adalah efektivitasnya dalam emulsifikasi pada beberapa rentang pH, suhu dan salinitas (Banat et al., 2000). Biosurfaktan yang diisolasi dari kultur *B. subtilis* C19 juga diujikan pada beberapa variasi tersebut, diantaranya pada rentang pH dan kadar garam (NaCl). Digunakan kerosen sebagai substrat dan *crude biosurfactant* dengan konsentrasi 0.2% (w/v) pada 100 mL aquades sebagai larutan. Kerosen merupakan campuran kompleks hidrokarbon aromatik dan alifatik, C₁₆-C₂₀ (Speight JG, 1999). Efektivitas emulsi sebagai bioemulsifier yang efektif pada konsentrasi yang rendah (0.001-0.1%) dan terjadi pada emulsifikasi campuran aromatik dan alifatik.

a Pengaruh pH terhadap stabilitas emulsi

Sebanyak 4 ml larutan yang telah divariasikan pH (3, 5, 7, 9, dan 12) (Helmy et al., 2010; Velasco et al., 2006) dicampurkan dengan substrat minyak (1:1, v/v) kemudian divortex selama 1 menit, dan didiamkan selama 24 jam untuk selanjutnya diukur aktivitas emulsinya. Hasilnya dapat dilihat dari tabel berikut:

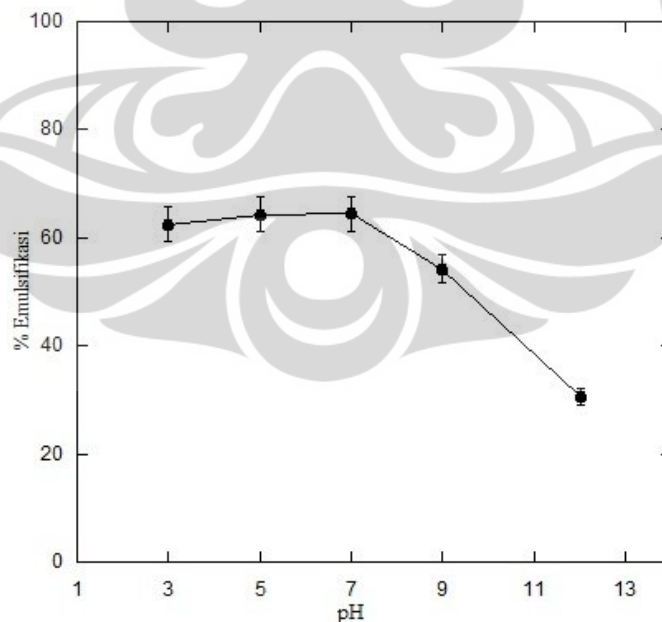
Tabel 4. 6 Emulsifikasi *crude biosurfactant* (0.2%, w/v) pada variasi pH

pH	% Emulsi
3	62.5
5	64.29
7	64.41
9	54.29
12	30.67



Gambar 4. 18 Emulsifikasi *crude biosurfactant* (0.2%, w/v) pada variasi pH

Dari hasil emulsifikasi larutan *crude biosurfactant* pada variasi pH, diketahui bahwa emulsifikasi terbaik terjadi pada pH 7 (netral) yakni sebesar 64.41 % emulsi. Tidak ada perbedaan aktivitas emulsifikasi yang signifikan yang terjadi pada pH 3 dan 5 (kondisi asam) serta pH 7 (netral). Sedangkan pada kondisi basa (pH 9 dan 12) terjadi penurunan aktivitas dengan persentase emulsi terkecil. Cooper dan Goldenberg (1987) juga mendapatkan aktivitas emulsifikasi senyawa aktif permukaan dari spesies *Bacillus cereus* terbaik pada pH 7, dan juga dengan penurunan aktivitas pada rentang pH yang lebih tinggi (pH > 7).



Gambar 4. 19 Emulsifikasi *crude biosurfactant* (0.2%, w/v) pada variasi pH

b Pengaruh kadar garam NaCl terhadap stabilitas emulsi

Sebanyak 4 ml larutan yang telah divariasikan kadar garam NaCl (0 %, 5%, 10%, 15%, dan 20%) (Velasco et al., 2006) dicampurkan dengan substrat minyak (1:1, v/v) kemudian divortex selama 1 menit, dan didiamkan selam 24 jam untuk selanjutnya diukur aktivitas emulsinya. Hasilnya dapat dilihat dari tabel berikut:

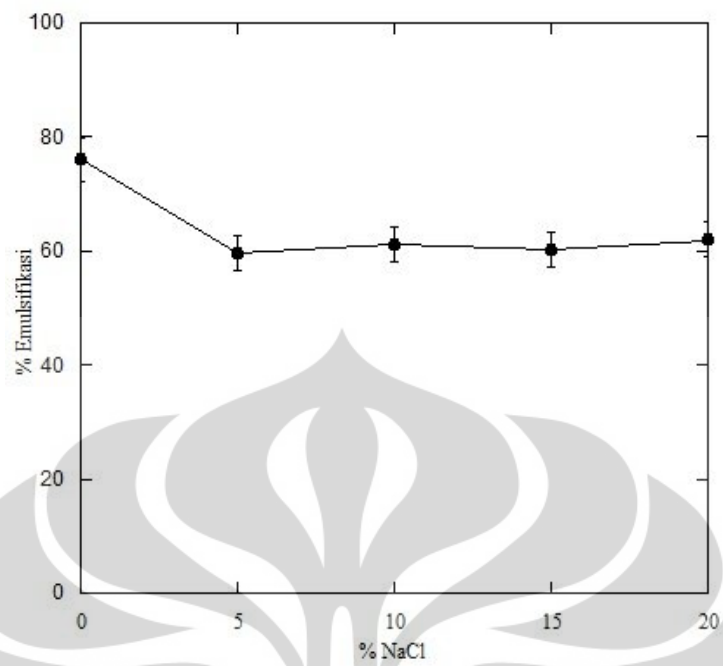
Tabel 4. 7 Emulsifikasi *crude biosurfactant* (0.2%, w/v) pada variasi NaCl (0-20%. w/v)

% NaCl (w/v)	% Emulsi
0	76.09
5	59.70
10	61.70
15	60.29
20	62.12

Studi efektivitas emulsifikasi pada variasi NaCl menunjukkan pengaruh yang signifikan dibandingkan tanpa adanya penambahan garam pada emulsi, artinya, penambahan garam pada emulsi menghambat aktivitas emulsifikasi. Velasco et al. (2006) dan Ilori et al. (2005) mendapatkan aktivitas terbaik pada penambahan 5 % NaCl masing-masing pada bioemulsifier yang dihasilkan oleh *Penicillium sp.* dan *Aeromonas sp.* dengan penurunan aktivitas emulsifikasi pada kadar garam yang lebih tinggi.



Gambar 4. 20 Emulsifikasi *crude biosurfactant* (0.2%, w/v) pada variasi NaCl (0-20%. w/v)



Gambar 4. 21 Emulsifikasi *crude biosurfactant* (0.2%, w/v) pada variasi NaCl (0-20%. w/v)

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian yang dilakukan pada proses biodegradasi pyrena dan produksi biosurfaktan oleh *Bacillus subtilis* C19 dapat diambil beberapa kesimpulan dan saran, yakni:

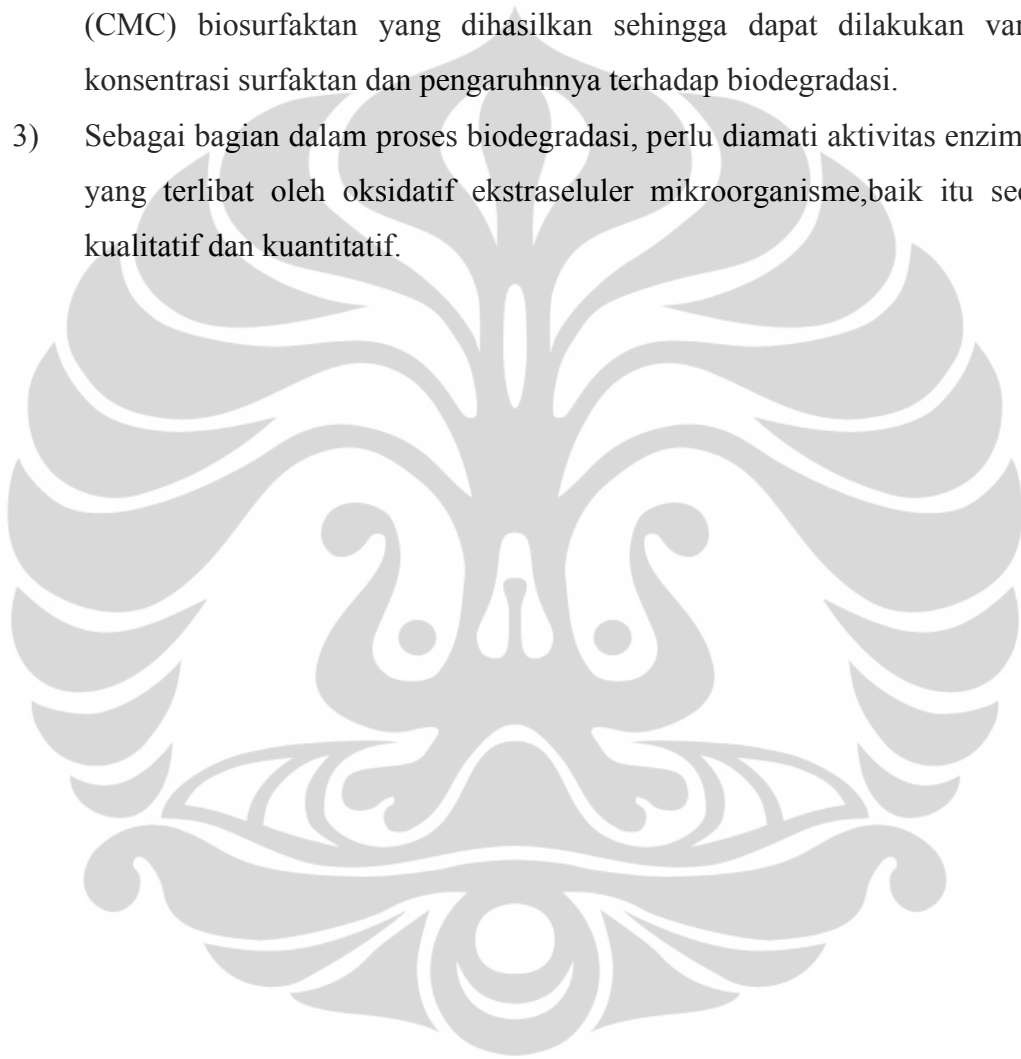
5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan pada proses biodegradasi pyrena dan produksi biosurfaktan oleh *Bacillus subtilis* C19 dapat diambil beberapa kesimpulan, yakni:

- 1) Dari data laju pertumbuhan spesifik (μ) pada masing-masing konsentrasi pyrena, diketahui bahwa konsentrasi kritis pyrena yang terlarut dalam media pada biodegradasi adalah pada konsentrasi 200 mg/L. Konsentrasi ini memberikan pertumbuhan biomassa yang baik selama biodegradasi dengan kelarutan pyrena oleh biosurfaktan yang paling baik pula.
- 2) Pada konsentrasi pyrena yang sangat tinggi (lebih dari 200 mg/L), proses biodegradasi pyrena tidak berjalan baik karena kelarutan yang kecil dan terjadinya inhibisi substrat yang menghambat pertumbuhan biomassa, seperti pada konsentrasi 500 mg/L.
- 3) Persentasi pyrena yang terdegradasi untuk masing-masing konsentrasi 40 mg/L, 200 mg/L dan 500 mg/L pada hari ke-28 inkubasi adalah sebesar 94.10%, 87.20% dan 87.65%.
- 4) Isolasi dan karakterisasi terhadap biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* C19 menunjukkan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan adalah jenis surfaktin kelompok lipopeptida.
- 5) Pengukuran stabilitas emulsi dilakukan terhadap variasi pH dan kadar garam (NaCl) pada konsentrasi larutan 0.2% *crude biosurfactant* *B. subtilis* C19 dengan substrat minyak kerosen mendapatkan persentasi emulsi terbaik masing-masing pada pH 7 (netral) dan tanpa penambahan NaCl (0%).

5.5 Saran

- 1) Perlu dilakukan analisa kuantitatif terhadap kelarutan pyrena sehingga penelitian degradasi pyrena adalah menggunakan pyrena terlarut baik itu dalam fase cair (C_a) dan fase misel surfaktan (C_{mic}) dan pengaruhnya dalam proses biodegradasi.
- 2) Perlu juga dilakukan analisa kuantitatif terhadap konsentrasi misel kritis (CMC) biosurfaktan yang dihasilkan sehingga dapat dilakukan variasi konsentrasi surfaktan dan pengaruhnya terhadap biodegradasi.
- 3) Sebagai bagian dalam proses biodegradasi, perlu diamati aktivitas enzimatik yang terlibat oleh oksidatif ekstraseluler mikroorganisme, baik itu secara kualitatif dan kuantitatif.



DAFTAR PUSTAKA

- Abuhamed, T., E. Bayraktar, et al. (2004). *Kinetics Model for Growth of Pseudomonas putida F1 During Benzene, Toluene and Phenol Biodegradation*. Process Biochemistry 39: 983-988
- Agarry, S. E. and B. O. Solomon (2008). *Kinetics of Batch Microbial Degradation of Phenols by Indigenous Pseudomonas fluorescence*. International Journal Environment Science Technology 5 (2): 223-232.
- Bai, J., J.-P. Wen, et al. (2006). *Kinetic Modeling of Growth and Biodegradation of Phenol and m-Cresol using Alcaligenes faecalis*. Process Biochemistry 42: 510-517.
- Bayoumi, R. A., B. M. Haroun, et al. (2010). *Structural Analysis and Characteristics of Biosurfactants Produced by Some Crude Oil Utilizing Bacterial Strains*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 4 (8): 3484-3498.
- Cerneglia, C. E., S.-J. Kim, et al. (2006). *Complete and Integrated Pyrene Degradation Pathway in Mycobacterium vanbaalenii PYR-1 Based on Systems biology*. Journal of Bacteriology Vol.189, No. 2: 464-472.
- Cooper, G. and B. Goldenberg (1987). *Surface Active Agents from Two Bacillus species*. Appl Environ Microbiol 53: 224-229.
- Cottin, N. C. and G. Merlin (2007). *Study of Pyrene Biodegradation Capacity in Two Types of Solid Media*. Science of the Total Environment 380((2007)): 116-123.
- Dan, S., L. i. Pei-Jun, et al. (2006). *Biodegradation of Benzo[a]pyrene in Soil by Mucor sp. SF06 and Bacillus sp. SB02 co-immobilized on Vermiculite*. Journal of Environmental Sciences 18(No. 6): 1204-1209.
- Das, K. and A. K. Mukherjee (2007). *Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability*. Journal of Applied Microbiology 102: 195-203.

- Eibes, G., T. Cajthaml, et al. (2006). *Enzymatic Degradation of Anthracene, Dibenzothiophene and Pyrene by Manganase Peroxidase in Media Containing Acetone*. Chemosphere 64: 408-414.
- Gokulakrishnan, S. and S. N. Gummadi (2005). *Kinetics of Cell Growth and Caffeine Utilization by Pseudomonas sp. GSC 1182*. Process Biochemistry 41: 1417-1421.
- Guha, S. and P. R. Jaffe (1996). *Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants*. Environ. Sci. Technol. 30: 605-511
- Helmy, Q., E. Kardena, Z. Nurachman, Wisjnuaprpto. 2010. *Application of Biosurfactant Produced by Azotobacter vinelandii AV01 for Enhanced Oil Recovery and Biodegradation of Oil Sludge*. International Journal of Civil & Environmental Engineering IJCEE. Vol : 10 No : 01
- Hwang, S. and T. J. Cutright (2002). *Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil*. Chemosphere 47: 891-899.
- Juang, R.-S. and S.-Y. Tsai (2006). *Growth Kinetics of Pseudomonas putida in the Biodegradation of Single and Mixed Phenol and Sodium Salicylate*. Biochemical Engineering Journal 31: 133-140.
- Kumar, A., P. Chaudary, et al. (2006). *Degradation and Detoxification of Hexachlorocyclohexane Isomers by Pseudomonas aeruginosa ITRC-5*. International Biodeterioration & Biodegradation 57: 107-113.
- Lakshmi, M. B. and M. Velan (2011). *Biodegradation of The Toxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, Phenanthrene by an Indigenously Isolated Alcaligenes Faecalis MVMB1 strain*. 2nd International Conference on Environmental Science and Technology. Singapore, IACSIT Press. 6
- Li, J. L. and B. H. Chen (2008). *Effect of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene by a marine bacteria of Neptunomonas naphovorans*. Journal of Hazardous Material 162: 66-73
- Li, J.-L. and B.-H. Chen (2009). *Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Materials 2: 76-94.
- Liu, P.-W. G., T. C. Chang, et al. (2011). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategied and microbial*

- community shift*. International Biodeterioration & Biodegradation 65: 1119-1127.
- Luna-Velasco, M. A., F. Esparza-Garcia, et al. (2006). *Production and Properties of a Bioemulsifier synthesized by Phenanthrene-Degrading Penicillium sp.* Process Biochemistry 42: 310-314
- Mahanty, B., K. Pakshirajan, et al. (2007). *Biodegradation of pyrene by Mycobacterium frederiksbergense in a two-phase partitioning bioreactor system*. Bioresource Technology 99: 2694-2698.
- Pacwa-Plociniczak, M., G. A. Plaza, et al. (2011). *Environmental Applications of Biosurfactants : Recent Advances*. International Journal of Molecular Sciences 12 (633-654).
- Ramirez, N., T. Cutright, et al. (2000). *Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by Mycobacterium PYR-1 and enriched consortium*. Chemosphere 44: 1079-1086.
- Rodrigues, L. R., J. A. Teixeira, et al. (2006). *Low-Cost Fermentative Medium for Biosurfactant Production by Probiotic Bacteria*. Biochemical Engineering Journal Volume 32: 135-142.
- Romero, M. C., M. L. Salvioli, et al. (2002). *Pyrene Degradation by Yeast and Filamentous Fungi*. Environmental Pollution 117: 159-163.
- Salehizadeh, H. and S. Mohammadizad (2009). *Microbial Enhanced Oil Recovery Using Biosurfactant Produced by Alcaligenes faecalis*. Iranian Journal of Biotechnology 7: 216-223
- Saravanan, P., K. Pakshirajan, et al. (2006). *Growth Kinetics of an Indigenous Mixed Microbial Consortium during Phenol Degradation i a Batch Reactor*. Bioresource Technology 99: 205-209.
- Sarma, S. J. and K. Pakshirajan (2010). *Surfactant aided biodegradation of pyrene using immobilized cells of Mycobacterium frederiksbergense*. International Biodeterioration & Biodegradation 65: 73-77.
- Sgountzos, I. N., S. Pavlou, et al. (2006). *Growth Kinetics of Pseudomonas fluorescence in Sand Beds during Biodegradation of Phenol*. Biochemical Engineering Journal 30: 164-173.

- Shin, K.-H., J.-Y. Kim, et al. (2008). *Effect of Biosurfactant Addition on the Biodegradation of Phenanthrene in Soil-Water System*. Environ. Engineering Vol. 13: 8-13.
- Sifour, M., H. Ouled-Haddar, et al. (2005). *Production of Biosurfactant from Two Bacillus Species*. Egyptian Journal of Aquatic Research 31(Special Issue): 142-148.
- Sivapathasekaran, C., S. Mukherjee, et al. (2010). *Biosurfactant Production and Growth Kinetics of Bacteria in a Designer Marine Medium: Improved Physiochemical Properties*. Biotechnology Journal. Volume 5: 1060-1068.
- Thaniyavarn, J., N. Roongsawang, et al. (2003). *Production and Characterization of Biosurfactants from Bacillus licheniformis F2.2*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 (6): 1239-1244.
- Tiehm, A. (1993). *Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants*. Applied and Environmental Microbiology Vol. 60 No. 1: 258-263
- Ting, W. T. E., S. Y. Yuan, et al. (2011). *Biodegradation of Phenanthrene and Pyrene by Ganoderma lucidum*. International Biodeterioration & Biodegradation 65: 238-241.
- Toledo, F. L., J. Gonzales-Lopez, et al. (2008). *Production of Bioemulsifier by Bacillus subtilis, Alcaligenes faecalis and Enterobacter species in Liquid Culture*. Biosource Technology 99: 8470-8475.
- Vrana, B., K. Dercova, et al. (2008). *Four-Compartmental Kinetic Model of the Simultaneous Processes Occurring Throughout Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls in the Active Bacterial Cell Suspension*. Acta Chimica Slovaca Vol. 1: 329-349.
- Yudono, B., M. Said, et al. (2010). *Kinetics of Petroleum-Contaminated Soil Biodegraded by An Indigenous Bacteria Bacillus megaterium*. Hayati Journal of Biosciences Vol. 17: 155-160.

LAMPIRAN A
DATA ABSORBANSI (OD) KURVA PERTUMBUHAN SEL KULTUR
BIODEGRADASI

Tabel A.1 OD (Optical Density) Sel Kultur selama Proses Biodegradasi

Hari 2					Hari 12				
No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm	No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	1.188	1.359	1.275	1.716	1	1.946	2.490	2.280	2.440
2	1.186	1.363	1.284	1.714	2	1.940	2.500	2.280	2.440
3	1.187	1.365	1.281	1.709	3	1.942	2.490	2.280	2.440
OD rata-rata	1.187	1.362	1.280	1.713	OD rata-rata	1.943	2.493	2.280	2.440

Hari 4					Hari 14				
No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm	No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	1.511	1.815	1.989	1.879	1	1.624	2.330	1.960	2.210
2	1.512	1.803	1.986	1.874	2	1.619	2.330	1.959	2.200
3	1.516	1.804	1.989	1.855	3	1.619	2.330	1.956	2.200
OD rata-rata	1.513	1.807	1.988	1.869	OD rata-rata	1.621	2.330	1.958	2.203

Hari 6					Hari 16				
No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm	No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	1.593	2.050	2.220	2.170	1	1.565	2.030	1.948	2.130
2	1.591	2.050	2.220	2.160	2	1.562	2.030	1.948	2.130
3	1.594	2.050	2.220	2.170	3	1.564	2.030	1.950	2.130
OD rata-rata	1.593	2.050	2.220	2.167	OD rata-rata	1.564	2.030	1.949	2.130

Hari 8					Hari 18				
No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm	No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	1.659	2.150	2.200	2.170	1	1.365	1.847	1.648	1.028
2	1.654	2.150	2.200	2.150	2	1.360	1.850	1.654	1.030
3	1.656	2.150	2.190	2.150	3	1.363	1.849	1.660	1.031
OD rata-rata	1.656	2.150	2.197	2.157	OD rata-rata	1.363	1.849	1.654	1.030

Hari 10				
No	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	1.625	2.300	2.210	2.270
2	1.620	2.290	2.220	2.270
3	1.620	2.280	2.230	2.270
OD rata-rata	1.622	2.290	2.220	2.270

Tabel A.2 OD (*Optical Density*) Rata-rata Sel Kultur selama Proses Biodegradasi

Hari	OD rata-rata			
	40 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm
2	1.187	1.362	1.280	1.713
4	1.513	1.807	1.988	1.869
6	1.593	2.050	2.220	2.167
8	1.656	2.150	2.197	2.157
10	1.622	2.290	2.220	2.270
12	1.943	2.493	2.280	2.440
14	1.621	2.330	1.958	2.203
16	1.564	2.030	1.949	2.130
18	1.363	1.849	1.654	1.030

Kultur biodegradasi dilakukan pengecekan OD pada $\lambda = 600 \text{ nm}$ selama proses biodegradasi. Nilai absorbansi memberikan besarnya OD (*optical density*) yang menunjukkan besarnya konsentrasi sel (biomassa) yang tumbuh dalam medium. Satuan absorbansi ($\lambda_{600\text{nm}}$) ini sebanding dengan besarnya konsentrasi sel (X) dalam g/L basis kering (Juang dan Tsai, 2006)

LAMPIRAN B
DATA ABSORBANSI (OD) KURVA PERTUMBUHAN SEL KULTUR
PRODUKSI BIOSURFAKTAN

Tabel B.1 OD (*Optical Density*) Sel Kultur selama Produksi Biosurfaktan

Hari 2			Hari 10		
No	100 ppm	Pengenceran 3 x	No	100 ppm	Pengenceran 8x
	0.502	1.506	1	0.544	4.352
2	0.504	1.512	2	0.542	4.336
3	0.505	1.515	3	0.545	4.360
4	0.502	1.506	4	0.545	4.360
5	0.503	1.509	5	0.540	4.320
OD rata-rata	0.503	1.510	OD rata-rata	0.543	4.346

Hari 4			Hari 12		
No	100 ppm	Pengenceran 4x	No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.453	1.812	1	0.657	5.256
2	0.457	1.828	2	0.662	5.296
3	0.452	1.808	3	0.657	5.256
4	0.454	1.816	4	0.656	5.248
5	0.460	1.840	5	0.657	5.256
OD rata-rata	0.455	1.821	OD rata-rata	0.658	5.262

Hari 6			Hari 14		
No	100 ppm	Pengenceran 4x	No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.684	2.736	1	0.675	5.400
2	0.691	2.764	2	0.678	5.424
3	0.685	2.740	3	0.676	5.408
4	0.684	2.736	4	0.675	5.400
5	0.690	2.760	5	0.678	5.424
OD rata-rata	0.687	2.747	OD rata-rata	0.676	5.411

Hari 8			Hari 16		
No	100 ppm	Pengenceran 6x	No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.589	3.534	1	0.564	4.512
2	0.586	3.516	2	0.561	4.488
3	0.589	3.534	3	0.560	4.480
4	0.585	3.510	4	0.562	4.496
5	0.585	3.510	5	0.560	4.480
OD rata-rata	0.587	3.521	OD rata-rata	0.561	4.491

Hari 18		
No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.501	4.008
2	0.500	4.000
3	0.496	3.968
4	0.497	3.976
5	0.497	3.976
OD rata-rata	0.498	3.986

Hari 24		
No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.399	3.192
2	0.398	3.184
3	0.400	3.200
4	0.397	3.176
5	0.398	3.184
OD rata-rata	0.398	3.187

Hari 20		
No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.454	3.632
2	0.460	3.680
3	0.460	3.680
4	0.461	3.688
5	0.462	3.696
OD rata-rata	0.459	3.675

Hari 26		
No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.355	2.840
2	0.354	2.832
3	0.352	2.816
4	0.352	2.816
5	0.353	2.824
OD rata-rata	0.353	2.826

Hari 22		
No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.428	3.424
2	0.429	3.432
3	0.429	3.432
4	0.428	3.424
5	0.428	3.424
OD rata-rata	0.428	3.427

Hari 28		
No	100 ppm	Pengenceran 8x
1	0.336	2.688
2	0.337	2.696
3	0.338	2.704
4	0.338	2.704
5	0.337	2.696
OD rata-rata	0.337	2.698

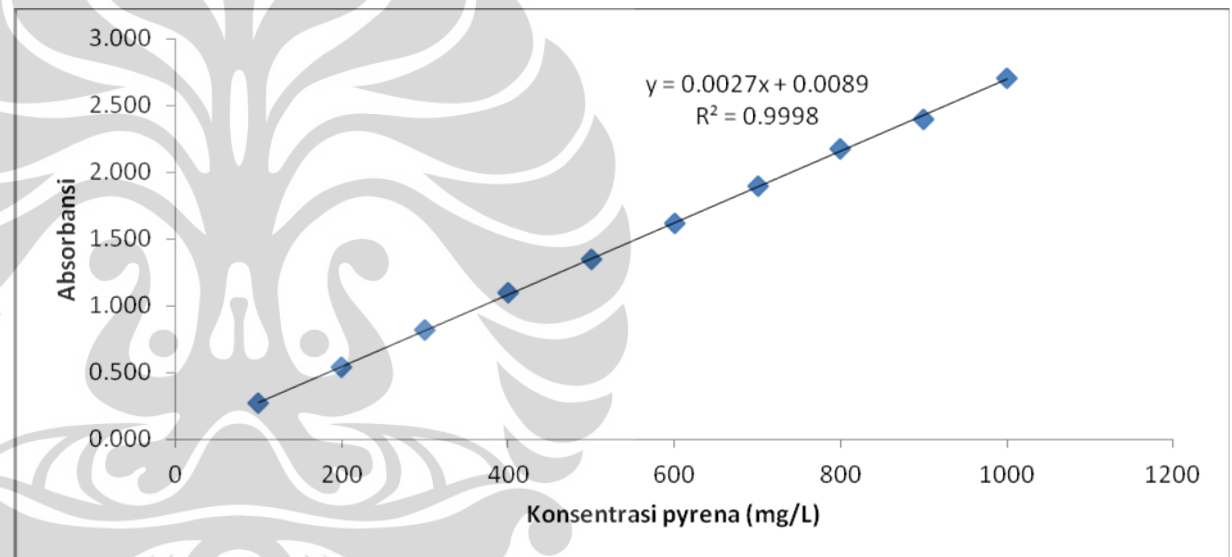
Table B.2 OD (*Optical Density*) Rata-rata Sel Kultur selama Produksi Biosurfaktan

Hari	OD rata-rata
2	1.510
4	1.821
6	2.747
8	3.521
10	4.346
12	5.262
14	5.411
16	4.491
18	3.986
20	3.675
22	3.427
24	3.187
26	2.826
28	2.698

LAMPIRAN C
DATA ABSORBANSI KULTUR BIODEGRADASI PYRENA

Tabel C.1 Data absorbansi kurva standar pyrena ($\lambda=348$ nm) dengan *blanko n*-heksana

Konsentrasi pyrena (mg/L)	Absorbansi
100	0.273
200	0.542
300	0.816
400	1.097
500	1.349
600	1.616
700	1.892
800	2.177
900	2.400
1000	2.702



Kurva standar pyrena dibuat antara absorbansi pyrena dengan konsentrasi 100-1000 mg/L pada panjang gelombang 200-400 nm. Hasil absorbansi pada tiap panjang gelombang kemudian diplot untuk mendapatkan koefisienn determinasi (R^2) paling baik. Dari hasil linierisasi dengan MS. Excel, didapatkan panjang gelombang terbaik ($R^2=0.9998$) yakni pada panjang gelombang $\lambda=348$ nm, dengan persamaan garis

$$y = 0.0027x + 0.0089$$

Dengan y adalah nilai absorbansi sampel dan x adalah konsentrasi pyrena (mg/L). Dengan demikian, untuk mendapatkan konsentrasi pyrena selama proses biodegradasi, dapat dilakukan dengan pengukuran nilai absorbansinya pada $\lambda=348$ nm, dimana konsentrasi pyrena dalam setiap pengambilan sampel adalah sebagai berikut:

$$x = \frac{y - 0,0089}{0,0027}$$

Tabel C.2 Data absorbansi kultur biodegradasi dengan *blanko* n-Heksana pada panjang gelombang $\lambda = 348$ nm

		Absorbansi ($\lambda=348$ nm) pada hari ke-													
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
Konsentrasi Pyrena	40	0.101	0.083	0.077	0.0675	0.0615	0.0455	0.0435	0.041	0.032	0.032	0.0235	0.021	0.01	0.009
	200	0.134	0.338	0.465	0.378	0.336	0.275	0.224	0.192	0.176	0.170	0.165	0.149	0.090	0.078
	500	0.894	0.841	1.025	0.987	0.899	1.022	1.012	1.035	0.994	0.820	0.733	0.268	0.233	0.176
	1000	0.040	0.049	0.050	0.074	0.184	0.246	0.256	0.510	0.533	0.824	1.697	1.697	0.870	0.652