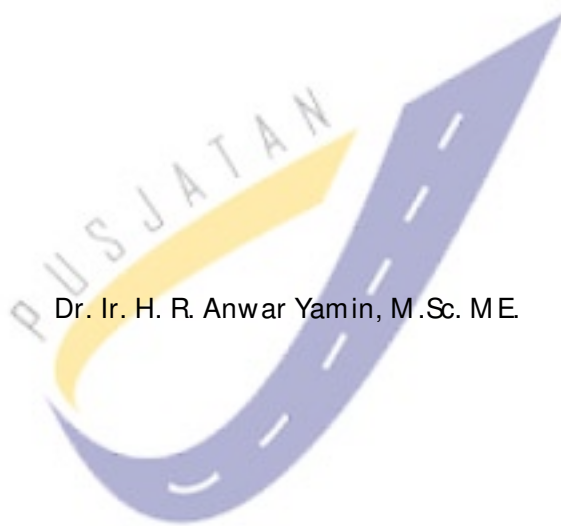




EKSTRAKSI ASBUTON DENGAN MIKROBA

(ISOLASI MIKROBA ASBUTON)



Dr. Ir. H. R. Anwar Yamin, M.Sc. M.E.



INFORMATIKA
Bandung

EKSTRAKSI ASBUTON DENGAN MIKROBA (ISOLASI MIKROBA ASBUTON)

Desember 2012

Cetakan Ke-1, tahun 2012, (viii + 72 Halaman)

© Pemegang Hak Cipta Pusat Penelitian dan Pengembangan Jalan dan Jembatan

No. ISBN : 978-602-1514-08-5
Kode Kegiatan : 02-PPK3-001107-H12
Kode Publikasi : IRE-TR-80/2012
Kata Kunci : Asbuton, Ekstraksi, Biologis, Surfaktan, Mikroba

Penulis:

Dr. Ir. H. R. Anwar Yamin, M.Sc. ME.

Editor:

Prof.(R) DR. Ir. M. Sjahdanulirwan, M.Sc.
Ir. Nyoman Suaryana, M.Sc.

Diterbitkan oleh:

Penerbit Informatika - Bandung

Anggota IKAPI Jabar Nomor : 033/JBA/99

Pemesanan melalui:

Perpustakaan Puslitbang Jalan dan Jembatan

info@pusjatan.pu.go.id

Kata Pengantar

Asbuton adalah aspal alam yang terdeposit di Indonesia. Saat ini, ada dua jenis asbuton yang sudah banyak terdapat dipasaran, yaitu asbutn butir dan asbuton *preblended*. Namun penggunaan kedua jenis asbuton ini masih dirasakan belum optimal karena baru bisa menggantikan aspal minyak sampai dengan 40% saja. Asbuton murni yang diharapkan dapat menggantikan 100% peranan aspal minyak saat ini masih dalam tahap pengembangan. Namun ada beberapa kendala yang dihadapi. Selain bahan yang digunakan sebagai pelarut bersifat tidak ramah lingkungan, mahalnya bahan dan sifat kimia pelarut yang digunakan dalam memproduksi asbuton murni merupakan kendala lainnya dalam memproduksi asbuton murni dengan sifat-sifat yang diinginkan dan kompetitif dengan aspal minyak. Penggunaan bahan pelarut alami juga sudah mulai digunakan tetapi belum menunjukkan hasil yang menggembirakan.

Usaha lainnya yang sudah mulai dilakukan untuk tujuan yang sama adalah pengembangan metode ekstraksi secara biologis dengan menggunakan mikroba. Namun tidak semua mikroba dapat digunakan untuk tujuan ini. Hanya mikroba indigen yang menghasilkan surfaktan yang dapat digunakan. Buku ini membahas isolasi mikroba indigen asbuton yang menghasilkan surfaktan. Buku ini merupakan bagian dari hasil penelitian ekstraksi asbiton dengan mikroba.

Buku ini diharapkan bermanfaat bagi peneliti dan produsen asbuton untuk mengembangkan metode ekstraksi asbuton secara biologis. Isi buku ini jauh dari sempurna, masukan ide dan saran yang konstruksif diharapkan untuk membuatnya lebih sempurna.

Bandung,
Desember 2012



Daftar Isi

Kata Pengantar	iii
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vii
Daftar Gambar	viii
 BAB I SEKILAS TENTANG ASBUTON	 1
1.1. Tataan Geologi Pulau Buton	2
1.2. Pendugaan Daerah Deposit Asbuton	4
1.3. Evolusi Teknologi Asbuton	13
 BAB II SEKILAS TENTANG MIKROBA	 15
2.1. Mikroba	15
2.2. Susunan Sel Mikroba	16
2.3. Medium Mikroba	16
2.3.1. Medium Dasar/Basal Mineral	17
2.3.2. Medium Sintetik	17
2.3.3. Medium Kompleks	18
2.3.4. Medium Diperkaya	18
2.4. Nutrisi Mikroba	19
2.5. Penggolongan Mikroba Berdasarkan Nutrisi dan Oksigen	20
2.5.1. Berdasarkan Sumber Karbon	20
2.5.2. Berdasarkan Sumber Energi	20
2.5.3. Berdasarkan Sumber Donor Elektron	20
2.5.4. Berdasarkan Sumber Energi dan Sumber Donor Elektron ...	21
2.5.5. Berdasarkan Kebutuhan Oksigen	21
2.6. Interaksi antara Mikroba Dalam Menggunakan Nutrien	22
2.7. Pertumbuhan Populasi Mikroba	22
2.7.1. Penghitungan Waktu Generasi Mikroba	24
2.7.2. Pengukuran Pertumbuhan Mikroba	24
2.8. Faktor Lingkungan untuk Pertumbuhan Mikroba	25
2.8.1. Faktor Biotik	25
2.8.2. Faktor Biotik	31

2.9. Mikrohabitat Dalam Struktur Tanah	33
2.10. Peranan dan Penggunaan Mikroba.....	33
2.11. Microbial Enhanced Oil Recovery	35
BAB III SURFAKTAN DAN BIOSURFAKTAN.....	39
3.1. Surfaktan.....	41
3.2. Biosurfaktan.....	42
BAB IV ISOLASI MIKROBA ASBUTON PENGHASIL SURFAKTAN	49
4.1. Pengambilan Sampel Asbuton Sumber Isolat Mikroba Hidrokarbonoklastik	49
4.2. Identifikasi Sifat dari Sample Asbuton.....	50
4.3. Isolasi Mikroba Hidrokarbonoklastik.....	51
4.4. Kultifasi	56
4.5. Screening Mikroba	57
4.5.1. Analisis Pertumbuhan	58
4.5.2. Analisis Biosurfaktan.....	59
4.6. Optimasi.....	63
4.7. Karakterisasi Isolat Mikroba Indigen Asbuton Penghasil Biosurfaktan	64
4.8. Identifikasi Mikroba Indigen Asbuton Perhasil Biosurfaktan	66
BAB V PENUTUP.....	67
Daftar Pustaka	69

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Perkiraan Cadangan Asbuton (ton) di Beberapa Daerah	6
Tabel 1.2.	Perkiraan Cadangan Asbuton di Lawele	7
Tabel 1.3.	Perkiraan Luas Daerah Sebaran Asbuton di Pulau Buton	9
Tabel 2.1.	Contoh Susunan Medium Dasar dan Medium Sintetik	17
Tabel 2.2.	Perbedaan Mikroba Berdasarkan Sumber Energi	20
Tabel 2.3.	Perbedaan Mikroba Berdasarkan Sumber Energi dan Sumber Donor Elektron	21
Tabel 2.4.	Kemungkinan Pengaplikasian MEOR dan Jenis Mikroba yang Digunakan	37
Tabel 3.1.	Biosurfaktan dan Mikroba Penghasilnya	46
Tabel 3.2	Jenis Mikroba dan Biosurfaktan Utama yang Dihasilkannya Melalui Proses MEOR	47
Tabel 4.1.	Sifat-sifat Asbuton yang Digunakan	50
Tabel 4.2.	Sumber Asbuton yang Digunakan Menghasilkan Mikroba	57
Tabel 4.3 .	Mikroba Asbuton Hasil Isolasi dari 60 Isolat	57
Tabel 4.4.	Hasil Analisis Pertumbuhan	60
Tabel 4.5	Hasil Analisis Biosurfaktan	62
Tabel 4.6.	OD Mikroba Penghasil Biosurfaktan	62
Tabel 4.7.	Biosurfaktan dan OD Isolat Kombinasi Mikroba	63
Tabel 4.8.	Hasil Optimasi Isolat Kombinasi LS5-LK3A	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Geologi Regional Pulau Buton	3
Gambar 1.2.	Formasi Tondo dan Sampolakosa Berumur Tersier Atas sebagai Formasi Pembawa Asbuton	5
Gambar 1.3.	Tipikal Hasil Pengeboran Titik BH-10-Kabungka	5
Gambar 1.4.	Sebaran Batuan yang Mengandung Asbuton di Daerah Kabungka	7
Gambar 1.5.	Sebaran Asbuton yang Relatif Dangkal di Kabupaten Buton	8
Gambar 1.6.	Hasil Interpolasi Kernel Polinomial Orde ke-5 pada Lapisan-1	10
Gambar 1.7.	Geometri Satuan Batu Gamping dan Satuan Batu Pasir Konglomeratan Lapisan-1	11
Gambar 1.8.	Hasil Interpolasi Kernel Polinomial orde ke-5 pada Lapisan-2	11
Gambar 1.9.	Geometri Satuan Batu Pasir Konglomeratan Lapisan-2	12
Gambar 4.1.	Tipikal Lokasi Pengambilan Sampel Asbuton di Pulau Buton	49
Gambar 4.2.	Sampel yang Diambil Secara Alami dari Pulau Buton	50
Gambar 4.3.	Peralatan untuk Proses Isolasi Mikroba	52
Gambar 4.4.	Medium Cair SMSSe	52
Gambar 4.5.	Pengocokan dan Kondisi Stationary Mikroba Pada Proses Isolasi Tahap I	53
Gambar 4.6.	Hasil Pemindahan Mikroba dengan Metoda <i>Spread Way</i> Pada Proses Isolasi Tahap II	54
Gambar 4.7.	Hasil Pengamatan Mikroskop Hasil Isolasi Tahap II	55
Gambar 4.8.	Medium SMSS Padat Miring untuk Pembiakan Mikroba, Proses Isolasi Tahap III	56
Gambar 4.9.	Proses Inkubasi Mikroba Asbuton	56
Gambar 4.10.	Hasil Uji Hemolisis Mikroba	61
Gambar 4.11.	Kurva Pertumbuhan Konsorsium Isolat Kode LS5-LK3A	65
Gambar 4.12.	Kurva Produksi Biosurfaktan Konsorsium Isolat Kode LS5-LK3A	65

Bab 1

SEKILAS TENTANG ASBUTON

Keberadaan aspal alam di Indonesia ditemukan di pulau Buton yang merupakan bitumen murni yang berasal dari pemisahan minyak bumi secara alamiah. Bitumen ini merupakan sisa dari minyak bumi yang memiliki berat jenis besar dan terperangkap pada reservoir batuan. Sejalan dengan waktu, gas dan minyak bumi dengan berat jenis ringan yang terkandung dalam batuan tersebut menguap sehingga menyisakan bitumen yang terperangkap dalam matriks batuan tersebut. Aspal alam ini dikenal sebagai Asbuton.

Sejauh ini, pemanfaatan asbuton belum banyak dilakukan. Mahalnya biaya eksplorasi dan ketidakjelasan deposit serta pasar asbuton menyebabkan kurangnya minat investor untuk berinvestasi baik di hulu ataupun di hilir dalam pemanfaatan asbuton sehingga timbulnya kesulitan untuk mendapatkan asbuton secara tepat waktu dan kurang kompetitifnya harga asbuton dibandingkan baik dengan harga semen ataupun dengan harga aspal. Untuk itu, perlu insentif pemerintah untuk menjadikan pulau Buton sebagai *blue acean* bagi investor untuk berinvestasi khususnya yang berkenaan dengan pemanfaatan asbuton.

1.1. Tataan Geologi Pulau Buton

Batuan yang tersingkap di pulau Buton memiliki umur batuan mulai dari zaman Mesozoik hingga Kuartar. Sebaran paling luas dari batuan pra-Tersier ditemukan pada bagian ujung Utara Buton Selatan, sedangkan batuan Kuartar yang didominasi oleh satuan batu gamping terumbu, tersebar di bagian Selatan dan Tengah pulau Buton.

Menurut Sikumbang et al., (1995), pergerakan tektonik di pulau Buton telah terjadi beberapa kali dimulai sejak pra-Eosen. Oleh sebab itu, pola tektonik pulau Buton sukar ditentukan karena seluruh batuanannya telah mengalami beberapa kali perlipatan dan pergeseran. Gerak tektonik utama yang membentuk pola struktur hingga sekarang diperkirakan terjadi pada masa Eosen-Oligosen yang membentuk struktur imbrikasi berarah Timurlaut – Baratdaya. Pergerakan tektonik berikutnya terjadi antara masa Pliosen-Plistosen yang mengakibatkan terlipatnya batuan pra-Pliosen. Kegiatan tektonik terakhir terjadi sejak Plistosen dan masih berlangsung hingga sekarang yang mengakibatkan terangkatnya pulau Buton dan pulau Muna secara perlahan, sejalan dengan pembentukan batu gamping terumbu Formasi Wapulaka yang berundak-undak.

Pulau Buton disusun oleh batuan yang dikelompokkan ke dalam batuan masa Mesozoikum berumur Trias hingga masa Kapur-Atas bahkan hingga masa Paleosen yang terdiri atas Formasi Winto, Formasi Ogena, Formasi Rumu, dan Formasi Tobelo. Kelompok kedua adalah batuan masa Kenozoikum berumur Miosen dan Plistosen yang menutupi sebagian besar pulau Buton. Susunan batuan kelompok ini terdiri atas Formasi Tondo, Formasi Sampolakosa dan Formasi Wapulaka yang diendapkan pada masa Miosen awal hingga Plistosen. Formasi Winto merupakan formasi tertua yang tersingkap di pulau Buton yang berumur Trias akhir. Litologinya terdiri atas perselingan batu serpih, batu pasir, konglomerat dan batu gamping, dan mengandung sisa tumbuhan, kayu serta sisipan tipis batubara dengan lingkungan pengendapan

neritik tengah hingga neritik luar seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.1 (Sikumbang et al., 1995).



Gambar 1.1. Geologi Regional Pulau Buton (Sikumbang et al., 1995)

Peristiwa tektonik yang terjadi berkali-kali di pulau Buton menyebabkan terjadinya struktur perlipatan berupa antiklin dan sinklin, serta struktur sesar yang terdiri atas sesar naik, sesar normal dan sesar geser mendatar di pulau tersebut. Secara garis besar, struktur berarah Timurlaut-Baratdaya terdapat di bagian Selatan pulau Buton. Di Buton Tengah, strukturnya berarah Utara-Selatan. Sedangkan di Buton Utara, strukturnya berarah Utara-Baratlaut hingga Selatan - Tenggara. Di pulau ini, sesar-sesar mendatar umumnya memotong struktur utama yang merupakan struktur antiklin-sinklin, dimana secara garis besar struktur ini memiliki arah yang relatif sejajar dengan arah memanjang batuan masa pra-Tersier.

Peristiwa tektonik yang berkali-kali terjadi di pulau Buton ini juga menyebabkan batuan-batuan yang berumur lebih tua mengalami beberapa kali deformasi struktur sehingga batuan yang lebih tua di pulau ini umumnya dijumpai dengan kemiringan lapisan yang relatif tajam, sedangkan batuan yang lebih muda kemiringannya lapisan relatif lebih landai dibandingkan dengan batuan yang berumur tua.

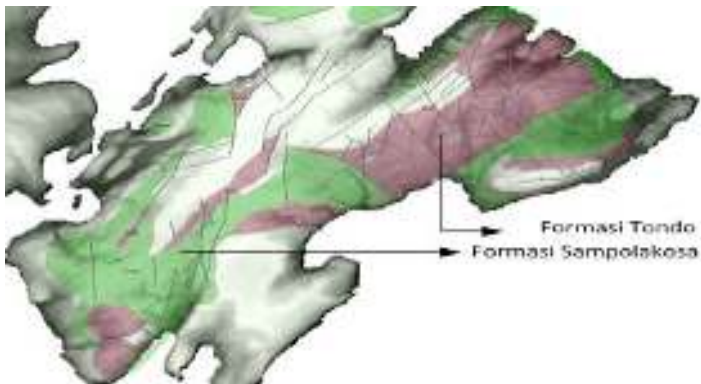
Selain itu, peristiwa-peristiwa tektonik yang terjadi menyebabkan terjadinya perbedaan pola struktur dari pulau Buton secara keseluruhan, dimana secara garis besar terdapat tiga bagian pola yang berbeda yaitu pola bagian Selatan, pola bagian Tengah dan pola bagian Barat. Perlipatan dan patahan yang terbentuk sebagai dampak dari proses tektonik yang terjadi menghasilkan bentuk antiklinorium yang asimetris. Pola struktur di sebelah Selatan pulau memiliki arah Baratlaut-Timurlaut, bagian tengah pulau berarah Utara-Selatan, sedangkan selatan memperlihatkan arah utama Baratlaut-Tenggara sebagaimana yang telah ditunjukkan pada Gambar 1.1.

1.2. Pendugaan Daerah Deposit Asbuton

Keterdapatannya asbuton di bagian Selatan pulau Buton berkaitan erat dengan satuan batuan berumur Tersier yang terdapat pada Formasi Tondo dan Formasi Sampolakosa seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.2 (Sikumbang et al., 1995). Kedua formasi batuan ini tersusun atas satuan batu pasir dan satuan batu gamping. Kedua satuan batuan ini dianggap sebagai perangkap minyak yang bermigrasi hingga mencapai satuan batuan dari Formasi Tondo dan Sampolakosa tersebut. Pada kedua formasi ini, asbuton masuk melalui rekahan-rekahan yang terjadi yang dapat berupa sinklin-antiklin ataupun sesar-sesar yang kompleks yang terdapat pada kedua formasi ini. Di daerah Kabungka, asbuton terbentuk dalam rekahan batu gamping. Sedangkan di daerah Lawele asbuton ditemukan pada lapisan batu pasir sangat kasar dimana lapisan batu pasir tersebut merupakan bagian atas dari Formasi Sampolakosa.

Didasarkan pada bukti-bukti di lapangan, kebanyakan ahli geologi berteori bahwa aspal di pulau Buton berasal dari minyak mentah di kedalaman yang bermigrasi baik secara vertikal ke atas dan atau secara lateral (Hendri et al., 2011). Bahan atau gas yang lebih ringan yang terkandung dalam minyak yang bermigrasi ini menguap dan menyisakan residu berupa asbuton. Di beberapa

tempat, asbuton yang kental dan encer yang saat ini terus mengalir ke luar dari permukaan batu. Hanya satu ahli geologi mempertahankan tesisnya dengan menyatakan bahwa asbuton terbentuk dari lapisan bahan organik yang disebut proto-aspal tanpa membentuk fase minyak.



Gambar 1.2. Formasi Tondo dan Sampolakosa Berumur Tersier Atas sebagai Formasi Pembawa Asbuton

Berdasarkan pemetaan geologi dan peta struktur geologi serta peta geologi regional diketahui bahwa litologi tidak resmi dari Formasi Sampolakosa dan Formasi Tondo dapat dibagi menjadi empat satuan batuan, yaitu satuan batu pasir kelanauan, satuan batu gamping konglomerat (Formasi Tondo), satuan batu pasir napal serta satuan batu pasir gampingan (Formasi Sampolakosa).



Gambar 1.3. Tipikal Hasil Pengeboran Titik BH-10-Kabungka

Asbuton yang ditemui di lapangan secara alamiah umumnya massif. Asbuton ini berada pada lapisan dengan kemiringan 5 sampai 20 derajat, mempunyai pelamparan horizontal sesuai dengan arah jurus perlapisan serta perlamparan vertikal searah dengan sudut kemiringan lapisan. Pada Gambar 1.3 ditunjukkan hasil pengeboran yang dilakukan sampai dengan kedalaman 40 m dengan kedalaman maksimum pengeboran mencapai 67,5 m pada Formasi Sampolakosa dan Formasi Tondo. Pada gambar ini tebal singkapan lapisan asbuton di bawah permukaan bumi bervariasi dengan lebih dari 15 m.

Telah banyak studi yang dilakukan untuk memperkirakan deposit asbuton. Namun, studi-studi tersebut dilakukan secara parsial dan ada juga dengan hanya berdasarkan peta geologi saja. Dengan demikian, deposit asbuton yang didapat menjadi bias dan berbeda satu dengan yang lainnya. Pada Tabel 1.1 dan Tabel 1.2, ditunjukkan perkiraan cadangan asbuton yang didapat dari beberapa studi sebelumnya. Menurut Sulawesi Tenggara Dalam Angka Tahun 2009 (BPS, 2009-a), deposit asbuton adalah 3,5 milyar ton, sedangkan menurut Buton Dalam Angka Tahun 2010 (BPS, 2009-b), deposit asbuton adalah 680 juta ton.

Tabel 1.1. Perkiraan Cadangan Asbuton (ton) di Beberapa Daerah (Gompul, 1992)

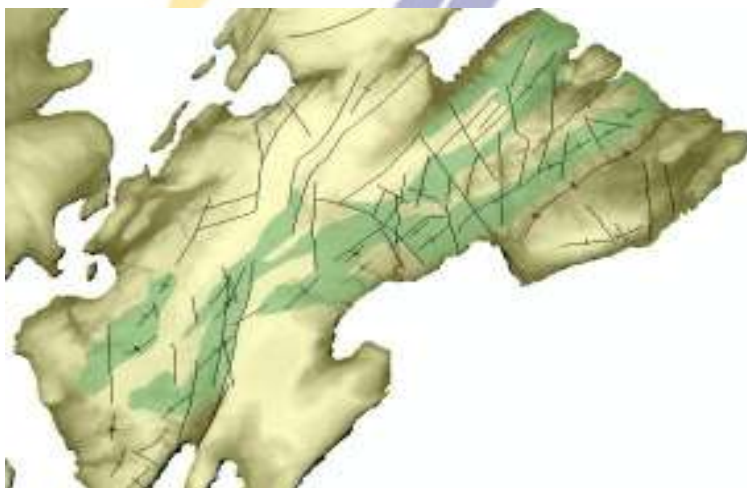
No	Lokasi	Bothe (1933)	PT.Saka (1986)
1	Waisin	3600	100 ribu
2	Kabungka	825 ribu	60 juta
3	Winto	kecil	3,2 juta
4	Wariti	-	600 ribu
5	Lawele	jutaan	100 juta

Studi terakhir yang dilakukan Puslitbang Jalan dan Jembatan (Pusjatan) Kementerian Pekerjaan pada tahun 2011 menyimpulkan bahwa satuan batu pasir kelanauan merupakan sumber utama asbuton yang terdapat di daerah Rongi dan Kabungka. Selain terdapat di satuan batu pasir kelanauan, di beberapa tempat pada satuan batu pasir gampingan juga mengandung asbuton tetapi di beberapa tempat lainnya hanya mengeluarkan aroma aspal.

Tabel 1.2. Perkiraan Cadangan Asbuton di Lawele (Kurniadji, 2003)

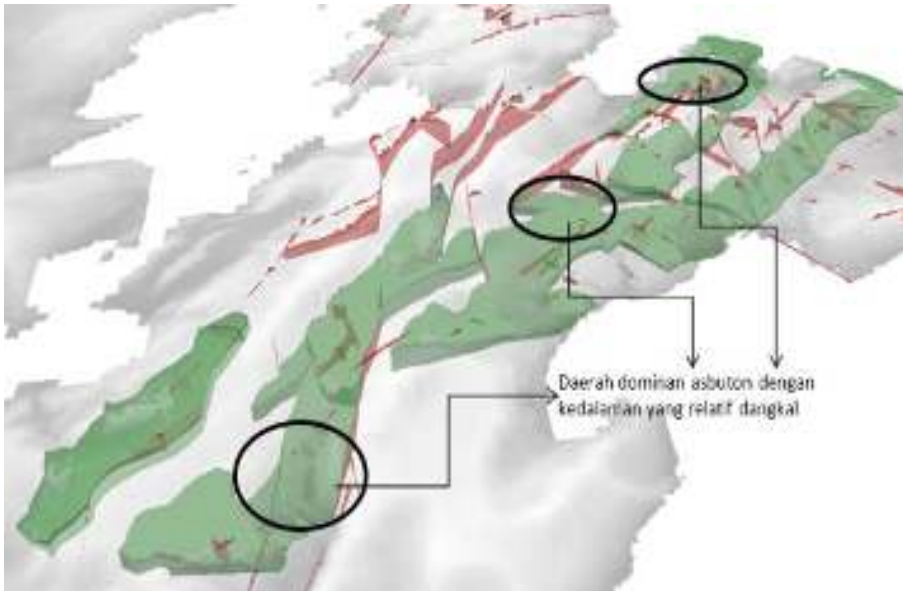
No	Daerah	Deposit Asbuton (juta ton)
1	Batu Awu	60,690
2	Mempenga	29,232
3	Lagunturu	37,149
4	Kabukubuku	41,325
5	Siantopina	181,25
6	Ulala	47,089

Melalui analisis dengan menghubungkan data singkapan batuan yang mengandung asbuton yang memiliki karakteristik yang sama dan selanjutnya mengkorelasikannya dengan data geolistrik yang memiliki nilai resistivity yang relatif sama yang diduga sebagai lapisan asbuton dan menginterpretasi hasilnya secara kualitatif menggunakan *software RockWork* (Roackware,---) dengan mempertimbangkan penyebaran litologi pembawa asbuton, stratigrafi, struktur geologi serta pengukuran arah jurus dan kemiringan lapisan serta mengintergrasikan hasilnya ke dalam program ArcGis Versi 10 (---, 2010), Pusjatan mendapatkan sebaran batuan (Gambar 1.4) yang mengandung asbuton di Kabupaten Buton.



Gambar 1.4. Sebaran Batuan yang Mengandung Asbuton di Daerah Kabungka

Pada bagian Utara dari Kabupaten Buton, sebaran asbuton secara umum berarah Timur laut - Barat daya. Sedangkan pada bagian Selatan, sebarannya cenderung relatif berarah Utara-Selatan. Di beberapa daerah (Gambar 1.5) di kabupaten ini, yang sebagian besar asbutonnya terdeposit pada daerah yang relatif dangkal.



Gambar 1. 5. Sebaran Asbuton yang Relatif Dangkal di Kabupaten Buton

Berdasarkan perhitungan secara spasial dapat diketahui bahwa perkiraan luas daerah yang mengandung asbuton di kabupaten Buton dan Buton Utara yaitu seperti yang diberikan pada Tabel 1.3. Secara keseluruhan luas daerah yang mengandung asbuton di pulau Buton diperkirakan sekitar 37.653,57 ha dengan rincian 36.966,77 ha terdapat di Kabupaten Buton dan 687 ha di Kabupaten Buton Utara. Selain tidak begitu luas, sebaran asbuton di Kabupaten Buton Utara tidak menerus, umumnya berupa rembesan bahkan hanya berupa bercak aspal. Berdasarkan hal ini, bahasan selanjutnya dari studi ini lebih fokus pada cadangan asbuton di Kabupaten Buton khususnya di daerah Kabungka.

Tabel 1.3. Perkiraan Luas Daerah Sebaran Asbuton di Pulau Buton

Nama Daerah	Luas Sebaran (m ²)
Kabupaten Buton	
– Rongi	57.755.000
– Kabungka	181.004.200
– Lawele	130.906.500
Total Kabupaten Buton	369.665.700
Kabupaten Buton Utara	
– Epe	1.720.000
– Rota	4.530.000
– Mandullah	620.000
Total Kabupaten Buton Utara	6.870.000
Total Pulau Buton	376.535.700

Pada lokasi pendugaan daerah Kabungka didapatkan 2 jenis pelapisan batuan yang memiliki ketebalan bervariasi. Kedua lapisan batuan ini terlipat kuat dengan adanya struktur antiklin dan sinklin, sesar naik dan sesar geser. Bentuk struktur seperti ini mencirikan bahwa batuan tersebut pernah berkali-kali mengalami tektonik yang cukup kuat.

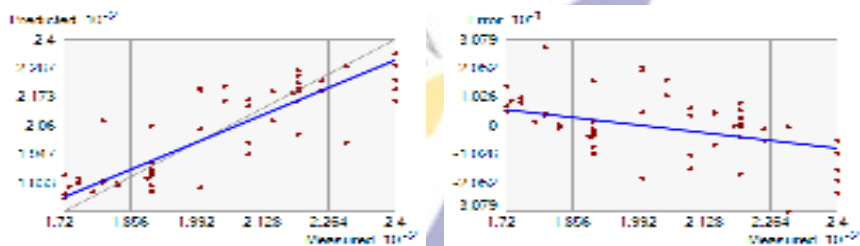
Dari nilai-nilai tahanan jenis pada daerah Kabungka ini dibuatkan peta isoresistivity. Peta ini kemudian diinterpolasi dengan menggunakan metoda interpolasi Kernel dengan memperhatikan batasan formasi batuan yang memiliki pola nilai tahanan jenis yang sangat berbeda. Dengan metoda ini didapatkan geometri lapisan batuan pada daerah tersebut, yaitu :

a. Lapisan-1

Lapisan batuan ini terdiri atas batu gamping yang merupakan lapisan paling atas dari Formasi Sampolakosa, serta lapisan batu pasir konglomeratan yang merupakan bagian dari Formasi Tondo. Kemunculan lapisan batuan ini dari permukaan pada ketinggian 240 mdpl (meter dari permukaan

laut) hingga pada ketinggian 172 mdpl dengan kedalaman rata-rata 38 meter. Pada Gambar 1.6, yang merupakan hasil *cross-validation* dari interpolasi Kernel Polinomial orde ke-5 dengan menggunakan Persamaan (2) pada Lapisan-1, dapat dilihat bahwa pada Lapisan-1 sedikitnya ada dua kelompok nilai tahanan jenis yang dinyatakan sebagai dua satuan batuan yang berbeda yaitu batu gamping dan batu pasir konglomeratan.

Data geostatistik yang dihasilkan, didapatkan gambaran geometri dari batuan yang pada Lapisan-1, yaitu seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.7. Berdasarkan gambar tersebut, volume pada batuan ini diperkirakan sebesar 703.228.655,69 Ton.

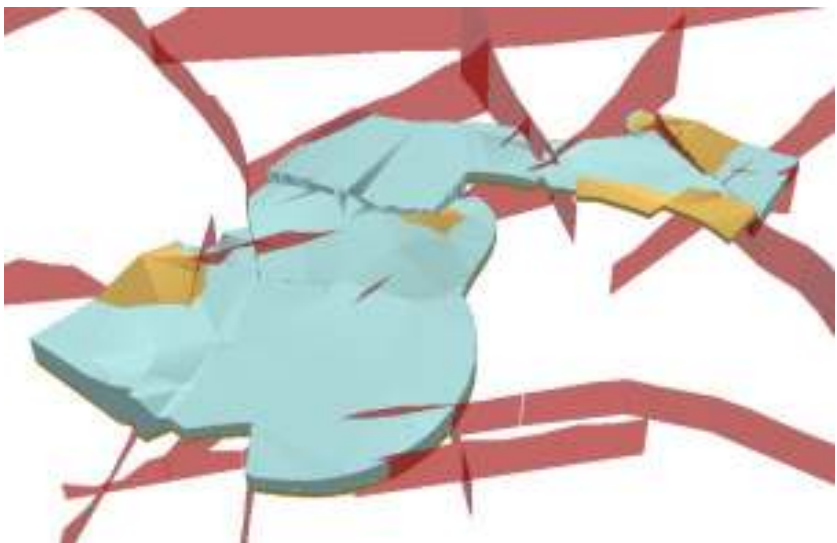


Gambar 1.6. Hasil Interpolasi Kernel Polinomial Orde ke-5 pada Lapisan-1

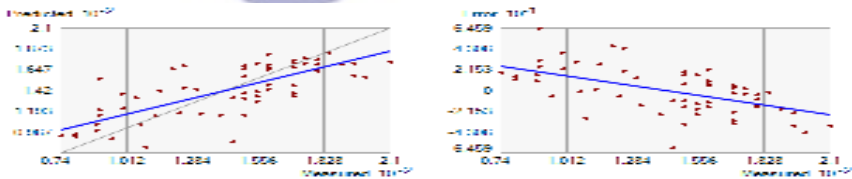
b. Lapisan-2

Lapisan batuan ini merupakan lapisan batu pasir konglomeratan yang juga merupakan bagian dari Formasi Tondo. Kemunculan lapisan batuan ini dari permukaan pada ketinggian 95 mdpl hingga pada ketinggian 230 mdpl dengan kedalaman hingga 20 meter dari permukaan. Gambar 1.8 yang merupakan hasil *cross-validasi* dari interpolasi Kernel Polinomial orde ke-5 memperlihatkan bahwa nilai tahanan jenis batuan di dominasi oleh satu kelompok batuan dengan tingkat *error* yang bervariasi. Hal ini kemungkinan disebabkan

karena adanya pengaruh tingkat kejenuhan aspal yang menutupi pori-pori pada batuan tersebut. Selain itu, *error* yang terjadi mungkin juga disebabkan karena adanya ini perkembangan patahan pada kedalaman ini. Gambaran geometri dari batuan yang pada Lapisan-2 ini seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.9. Berdasarkan gambar tersebut, volume batuan pada Lapisan-2 diperkirakan sebesar 417.077.994,41 Ton.



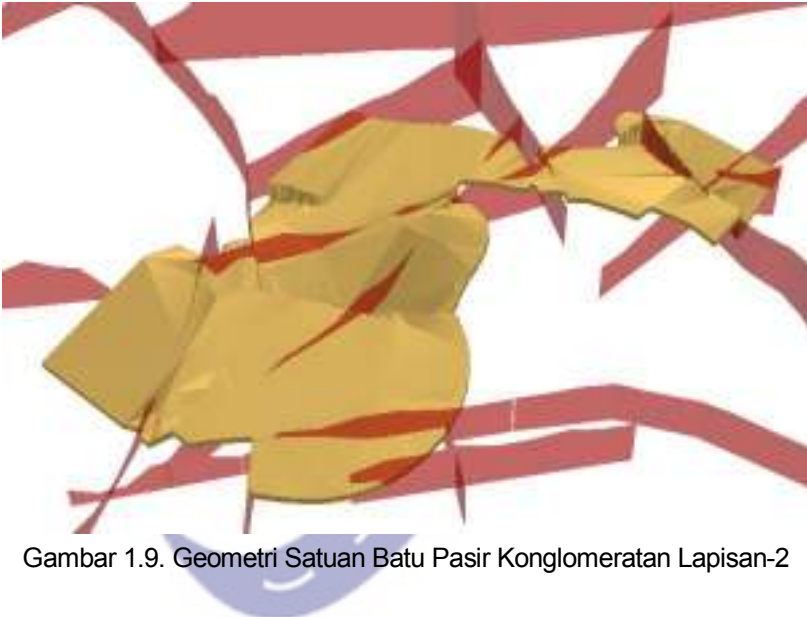
Gambar 1.7. Geometri Satuan Batu Gamping dan Satuan Batu Pasir Konglomeratan Lapisan-1



Gambar 1.8. Hasil Interpolasi Kernel Polinomial orde ke-5 pada Lapisan-2

Volume kedua lapisan ini memiliki ratio antara Lapisan-1 dan Lapisan-2 yaitu 0.63 : 0.37. Jika nilai ratio ini dianalogikan pada sebaran asbuton secara keseluruhan maka akan

dihasilkan nilai sumberdaya terkira pada daerah pulau Buton bagian selatan ini. Dari hasil beberapa titik bor diketahui bahwa pada Lapisan-1 kandungan asbuton pada batu gamping sangat sedikit dan cenderung berupa bintik-bintik hitam. Kadar asbuton pada lapisan ini diperkirakan hanya 1%. Sedangkan kandungan asbuton pada Lapisan-2 adalah lebih besar, yang ditunjukkan dengan banyaknya warna abu-abu sampai kehitaman pada batuan pada lapisan tersebut. Kadar asbuton pada lapisan ini diperkirakan sebesar 10%.



Gambar 1.9. Geometri Satuan Batu Pasir Konglomeratan Lapisan-2

Berdasarkan hal tersebut di atas dan dengan menggunakan *Volumetric Analysis* dari Reed (---), maka sumberdaya asbuton di daerah Buton Selatan diperkirakan sebesar 746.900.562,88 ton. Menurut BSN (1998), cadangan sumber daya yang didapat dari tahapan survey eksplorasi adalah cadangan sumber daya terukur (*measured resources*). Berdasar pernyataan tersebut, dapat dikatakan bahwa sumber daya asbuton terukur di Kabupaten Buton adalah sebesar 746.900.562,88 ton. Bila dari seluruh cadangan terukur tersebut diasumsikan memiliki

kandungan bitumen sebesar 5% maka 746.900.562,88 ton asbuton setara dengan 37.345.028,14 ton bitumen.

1.3. Evolusi Teknologi Asbuton

Secara umum karena asbuton ini merupakan aspal alam, variabilitas kandungan bitumen dan sifat-sifat teknisnya bervariasi antara satu deposit dengan deposit lainnya. Bahkan variabilitas juga terjadi untuk 1 titik penambangan yang sama, sehingga menyebabkan kesulitan dalam perencanaan campuran maupun penggunaannya. Kesulitan tersebut muncul lebih-lebih bila menggunakan asbuton konvensional, yaitu asbuton yang memiliki ukuran butir maksimum 12,7 mm yang didapat dari pemecahan langsung asbuton hasil tambang. Perkembangan selanjutnya untuk meminimalisasi kesulitan penggunaan asbuton konvensional ini adalah dengan menyeragamkan produk asbuton yang dihasilkan, sehingga dikenal istilah asbuton B16, B18 dan B20 dimana angka 16, 18 dan 20 menunjukkan persentase kadar bitumen yang dikandung asbuton tersebut. Dengan demikian diharapkan ketepatan perencanaan campuran beraspal akan menjadi lebih baik lagi. Disamping jenis asbuton konvensional muncul pula pabrik-pabrik yang memproduksi asbuton halus, asbuton mikro dan mastic asbuton.

Selain tetap memperkecil ukuran butir asbuton dan tetap menjaga kadar kandungan bitumennya, perkembangan selanjutnya untuk asbuton butir adalah menyeragamkan kekerasan bitumen dari asbuton tersebut, sehingga dikenal istilah asbuton butir 5/20, 15/20, 15/25 dan 20/25, Walaupun teknologi asbuton yang terakhir ini sudah cukup berhasil untuk mengatasi kelemahan asbuton sebagai bahan pengikat dalam campuran beraspal, tetapi persentase penggunaannya terhadap aspal minyak masih sangat sedikit, yaitu maksimum hanya 30% saja. Untuk meningkatkan kontribusinya, maka diperkenalkan asbuton butir *Lawele Granular Asphalt* (LGA), karena sifatnya yang lembek maka LGA

diharapkan dapat mensubstitusi aspal minyak sampai 75% dalam campuran beraspal.

Dengan munculnya aspal yang dimodifikasi dengan aditif seperti polimer untuk menghasilkan aspal baru yang tahan terhadap temperatur tinggi dan beban berat, pada tahun 2000-an Pusjatan bekerja sama dengan produsen asbuton, telah mengkaji pembuatan aspal yang dimodifikasi dengan asbuton. Jenis aspal campuran ini dikenal dengan nama asbuton pra campur. Didorong keinginan untuk mengoptimalkan penggunaan asbuton, baik dari segi fungsinya dalam suatu campuran beraspal maupun dalam jumlah penggunaannya maka saat ini telah diperkenalkan jenis produk asbuton yang dihasilkan dengan cara ekstraksi dimana kandungan mineral yang masih terdapat dalam produk Asbuton yang dihasilkan sudah lebih kecil dari 1%.



SEKILAS TENTANG MIKROBA

2.1. Mikroba

Mikroba atau mikroorganisme atau jasad renik adalah jasad hidup yang ukurannya kecil. Jasad renik disebut sebagai mikroba bukan hanya karena ukurannya yang kecil, sehingga sukar dilihat dengan mata biasa, tetapi juga pengaturan kehidupannya yang lebih sederhana dibandingkan dengan jasad tingkat tinggi (Madigan et al., 2008). Dengan ukurannya sangat kecil (biasanya dinyatakan dalam mikron, μ), sehingga untuk mengamatinya diperlukan alat bantuan. Sel mikroba umumnya hanya dapat dilihat dengan alat pembesar atau mikroskop. Oleh sebab itu, mikroorganisme disebut juga organisme mikroskopik (Madigan et al., 2008).

Mikroorganisme biasanya dianggap mencakup semua prokariota (jasad prokariotik/primitif, yaitu jasad yang perkembangan selnya belum sempurna), protista, dan alga renik. Kebanyakan orang beranggapan bahwa yang dapat dianggap mikroorganisme adalah semua organisme sangat kecil yang dapat dibiakkan dalam cawan petri atau inkubator di dalam laboratorium dan mampu memperbanyak diri secara mitosis.

Mikroorganisme seringkali bersel tunggal (*uniseluler*) maupun bersel banyak (*multiseluler*). Mikroorganisme berbeda dengan sel makroorganisme. Sel makroorganisme tidak bisa hidup bebas di alam melainkan menjadi bagian dari struktur multiselular yang membentuk jaringan, organ, dan sistem organ. Sementara, sebagian besar mikroorganisme dapat menjalankan proses kehidupan dengan mandiri, dapat menghasilkan energi sendiri, dan bereproduksi secara independen tanpa bantuan sel lain (Madigan et al., 2008).

2.2. Susunan Sel Mikroba

Susunan kimia sel mikroba relatif tetap, baik unsur kimia maupun senyawa yang terkandung di dalam sel. Dari hasil analisis kimia diketahui bahwa penyusun utama sel (unsur makro) adalah unsur kimia C, H, O, N, dan P, yang jumlahnya + 95 % dari berat kering sel, unsur mineral lainnya (unsur oligo) yang diperlukan sel ialah K, Ca, Mg, Na, S, Cl. Unsur mineral yang digunakan dalam jumlah sangat sedikit (unsur mikro) ialah Fe, Mn, Co, Cu, Bo, Zn, Mo, Al, Ni, Va, Sc, Si, Tu, dan sebagainya yang tidak diperlukan jasad. Apabila dilihat susunan senyawanya, maka air merupakan bagian terbesar dari sel, sebanyak 80-90 %, dan bagian lain sebanyak 10-20 % terdiri dari protoplasma, dinding sel, lipida untuk cadangan makanan, polisakarida, polifosfat, dan senyawa lain.

2.3. Medium Mikroba

Medium pertumbuhan (disingkat medium) adalah tempat untuk menumbuhkan mikroba. Susunan dan kadar nutrisi suatu medium untuk pertumbuhan mikroba harus seimbang agar mikroba dapat tumbuh optimal. Hal ini perlu dikemukakan mengingat banyak senyawa yang menjadi zat penghambat atau racun bagi mikroba jika kadarnya terlalu tinggi (misalnya garam dari asam lemak, gula, dan sebagainya). Disamping itu dalam medium yang terlalu pekat aktivitas metabolisme dan pertumbuhan mikroba dapat berubah. Perubahan faktor lingkungan menyebabkan aktivitas fisiologi mikroba dapat terganggu, bahkan mikroba dapat mati.

Medium memerlukan kemasaman (pH) tertentu tergantung pada jenis jasad yang ditumbuhkan. Aktivitas metabolisme mikroba dapat

mengubah pH, sehingga untuk mempertahankan pH medium ditambahkan bahan buffer. Beberapa komponen penyusun medium dapat juga berfungsi sebagai *buffer*.

Pada dasarnya, medium pertumbuhan mikroba dapat dikelompokkan dalam 4 kelompok, yaitu medium dasar, medium sintetik, medium kompleks dan medium diperkaya. Contoh dari keempat medium hidup mikroba seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.1.

2.3.1. Medium Dasar/Basal Mineral

Medium dasar adalah medium yang mengandung campuran senyawa anorganik. Medium dasar ini selanjutnya ditambah zat lain apabila diperlukan, misalnya sumber karbon, sumber energi, sumber nitrogen, faktor tumbuh, dan faktor lingkungan yang penting seperti pH dan oksigen serta tekanan osmosis.

Tabel 2.1 Contoh Susunan Medium Dasar dan Medium Sintetik (Sri, 2003)

Medium Dasar	Bahan Tambahan			
	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4
Air ; 1 liter K ₂ HPO ₄ ; 1 gram MgSO ₄ ·7H ₂ O ; 0,2 gram FeSO ₄ ·7H ₂ O; 0,01 gram CaCl ₂ ;0,01 gram Unsur mikro (garam Anorganik Mn,Mo, Cu, Co, Zn); masing-masing 0,02-0,5 mg	NH ₄ Cl; 1 grm	Glukosa;5 grm NH ₄ Cl; 1 grm	Glukosa;5 grm NH ₄ Cl; 1 grm Asam nikotinat; 0,1 grm	Glukosa;5 grm Ekstrak khamir

2.3.2. Medium Sintetik

Medium sintetik adalah medium yang seluruh susunan kimia dan kadarnya telah diketahui dengan pasti. Sebagai contoh adalah

medium dasar yang ditambah NH_4Cl (medium 1) dengan sumber karbon berupa gas CO_2 , apabila diinkubasikan dalam keadaan gelap dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba nitrifikasi khemoototrof, misalnya mikroba *Nitrosomonas*. Mikroba ini memperoleh energi dari oksidasi amonium, selain itu amonium juga berfungsi sebagai sumber nitrogen. Contoh lain adalah medium dengan susunan sama dengan medium 1 tetapi ditambah glukosa (medium 2). Dalam keadaan aerob merupakan medium untuk perbanyakkan jamur dan mikroba yang bersifat heterotrof. Glukosa berfungsi sebagai sumber karbon dan sumber energi. Dalam keadaan anaerob, medium ini dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba fakultatif anaerob maupun anaerob obligat. Energi diperoleh dari hasil fermentasi glukosa. Untuk menumbuhkan mikroba yang memerlukan faktor tumbuh dapat menggunakan medium yang komposisinya sama dengan medium 2 tetapi ditambah asam nikotinat (vitamin) sebagai faktor tumbuh (medium 3).

2.3.3. Medium Kompleks

Medium kompleks adalah medium yang susunan kimianya belum diketahui dengan pasti. Sebagai contoh medium ini adalah medium dasar yang ditambah glukosa dan ekstrak khamir (medium 4). Susunan kimia ekstrak khamir tidak diketahui secara pasti, tetapi mengandung berbagai faktor tumbuh yang sering diperlukan oleh mikroba. Medium ini dapat untuk menumbuhkan mikroba khemoheterotrof aerob maupun anaerob baik yang memerlukan maupun yang tidak memerlukan faktor tumbuh. Medium yang juga termasuk medium kompleks adalah yang mengandung ekstrak tanah.

2.3.4. Medium Diperkaya

Medium diperkaya adalah medium yang ditambah zat tertentu yang merupakan nutrisi spesifik untuk jenis mikroba tertentu. Medium ini digunakan untuk membuat kultur diperkaya (enrichment culture) dan untuk mengisolasi mikroba spesifik, dengan cara mengatur faktor lingkungan (suhu, pH, cahaya), kebutuhan nutrisi spesifik dan sifat fisiologinya. Dengan demikian dapat disusun medium diperkaya untuk mikroba yang bersifat khemoheterotrof, khemoototrof, fotosintetik, dan untuk mikroba lain yang bersifat spesifik.

2.4. Nutrisi Mikroba

Mikroba memerlukan nutrisi untuk memenuhi kebutuhan energi dan untuk bahan pembangun sel, untuk sintesa protoplasma dan bagian-bagian sel lain. Setiap mikroba mempunyai sifat fisiologi tertentu, sehingga memerlukan nutrisi tertentu pula.

Setiap unsur nutrisi mempunyai peran tersendiri dalam fisiologi sel. Unsur tersebut diberikan ke dalam medium sebagai kation garam anorganik yang jumlahnya berbeda-beda tergantung pada keperluannya. Beberapa golongan mikroba misalnya diatomae dan alga tertentu memerlukan silika (Si) yang biasanya diberikan dalam bentuk silikat untuk menyusun dinding sel. Natrium dalam kadar yang agak tinggi diperlukan oleh mikroba tertentu yang hidup di laut, algae hijau biru, dan mikroba fotosintetik. Natrium tersebut tidak dapat digantikan oleh kation monovalen yang lain.

Jasad hidup dapat menggunakan makanannya dalam bentuk padat maupun cair (larutan). Jasad yang dapat menggunakan makanan dalam bentuk padat tergolong tipe holozoik, sedangkan yang menggunakan makanan dalam bentuk cair tergolong tipe holofitik. Jasad holofitik dapat pula menggunakan makanan dalam bentuk padat, tetapi makanan tersebut harus dicernakan lebih dulu di luar sel dengan pertolongan enzim ekstraseluler. Pencernaan di luar sel ini dikenal sebagai extracorporeal digestion.

Bahan makanan yang digunakan oleh jasad hidup dapat berfungsi sebagai sumber energi, bahan pembangun sel, dan sebagai aseptor atau donor elektron. Dalam garis besarnya bahan makanan dibagi menjadi tujuh golongan yaitu air, sumber energi, sumber karbon, sumber aseptor elektron¹, sumber mineral, faktor tumbuh², dan sumber nitrogen.

¹ Proses oksidasi biologi merupakan proses pengambilan dan pemindahan elektron dari substrat. Karena elektron dalam sel tidak berada dalam bentuk bebas, maka harus ada suatu zat yang dapat menangkap elektron tersebut. Penangkap elektron ini disebut aseptor elektron. Aseptor elektron ialah agensia pengoksidasi. Pada mikrobia yang dapat berfungsi sebagai aseptor elektron ialah O^2 , senyawa organik, NO^3 , NO^2 , N_2O , SO_4^{2-} , CO_2 , dan Fe^{3+} .

² Faktor tumbuh ialah senyawa organik yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan (sebagai prekursor, atau penyusun bahan sel) dan senyawa ini tidak dapat disintesis dari sumber karbon yang sederhana. Faktor tumbuh sering juga.

2.5. Penggolongan Mikroba Berdasarkan Nutrisi dan Oksigen

2.5.1. Berdasarkan Sumber Karbon

Berdasarkan atas kebutuhan karbon jasad dibedakan menjadi jasad ototrof dan heterotrof. Jasad ototrof ialah jasad yang memerlukan sumber karbon dalam bentuk anorganik, misalnya CO₂ dan senyawa karbonat. Jasad heterotrof ialah jasad yang memerlukan sumber karbon dalam bentuk senyawa organik. Jasad heterotrof dibedakan lagi menjadi jasad saprofit dan parasit. Jasad saprofit ialah jasad yang dapat menggunakan bahan organik yang berasal dari sisa jasad hidup atau sisa jasad yang telah mati. Jasad parasit ialah jasad yang hidup di dalam jasad hidup lain dan menggunakan bahan dari jasad inang (hospes)-nya. Jasad parasit yang dapat menyebabkan penyakit pada inangnya disebut jasad patogen.

2.5.2. Berdasarkan Sumber Energi

Berdasarkan atas sumber energi jasad (mikroba) dibedakan menjadi jasad fototrof, jika menggunakan energi cahaya; dan khemotrof, jika menggunakan energi dari reaksi kimia. Jika didasarkan atas sumber energi dan karbonnya, maka dikenal jasad fotoototrof, fotoheterotrof, khemoototrof dan khemoheterotrof. Perbedaan dari keempat jasad tersebut Seperti yang diberikan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Perbedaan Mirkoba Berdasarkan Sumber Energi (Sri, 2003)

Jasad	Sumber Karbon	Sumber Energi
Fotoototrof	zat anorganik	Cahaya matahari
Fotoheterotrof	zat organik	Cahaya matahari
Khemotrof	Zat anorganik	Oksidasi zat anorganik
khemoheterotrof	Zat organik	Oksidasi zat organik

2.5.3. Berdasarkan Sumber Donor Elektron

Berdasarkan atas sumber donor elektron jasad digolongkan menjadi jasad litotrof dan organotrof. Jasad litotrof ialah jasad yang dapat menggunakan donor elektron dalam bentuk senyawa anorganik

seperti H₂, NH₃, H₂S, dan S. jasad organotrof ialah jasad yang menggunakan donor elektron dalam bentuk senyawa organik.

2.5.4. Berdasarkan Sumber Energi dan Sumber Donor Elektron

Berdasarkan atas sumber energi dan sumber donor elektron jasad (mikroba) dapat digolongkan menjadi jasad fotolitotrof, fotoorganotrof, khemolitotrof, dan khemoorganotrof. Perbedaan keempat golongan jasad tersebut seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.3 (Sri, 2003).

Tabel 2.3 Perbedaan Mikroba Berdasarkan Sumber Energi dan Sumber Donor Elektron

Jasad	Sumber Energi	Sumber Donor Elektron	Contoh
Fotolitotrof	Cahaya	zat anorganik	Tumbuhan tingkat tinggi, alga
Fotoorganotrof	Cahaya	zat organik	Mikroba belerang fotosintetik
Khemolitotrof	Oksidasi zat anorganik	Zat anorganik	Mikroba besi, mikroba hidrogen, mikroba nitrifikasi
khemoorganotrof	Oksidasi zat organik	Zat organik	Jasad heterotrof

2.5.5. Berdasarkan Kebutuhan Oksigen

Berdasarkan akan kebutuhan oksigen, jasad dapat digolongkan dalam jasad aerob, anaerob, mikroaerob, anaerob fakultatif, dan kapnofil. Jasad aerob ialah jasad yang menggunakan oksigen bebas (O₂) sebagai satusatunya aseptor hidrogen yang terakhir dalam proses respirasinya. Jasad anaerob, sering disebut anaerob obligat atau anaerob 100% ialah jasad yang tidak dapat menggunakan oksigen bebas sebagai aseptor hidrogen terakhir dalam proses respirasinya. Jasad mikroaerob ialah jasad yang hanya memerlukan oksigen dalam jumlah yang sangat sedikit. Jasad aerob fakultatif ialah jasad yang dapat hidup dalam keadaan anaerob maupun aerob. Jasad ini juga bersifat anaerob toleran. Jasad kapnofil ialah jasad yang memerlukan kadar oksigen rendah dan kadar CO₂ tinggi.

2.6. Interaksi antara Mikroba Dalam Menggunakan Nutrien

Jika dua atau lebih jasad (mikroba) yang berbeda ditumbuhkan bersama-sama dalam suatu medium, maka aktivitas metabolismenya secara kualitatif maupun kuantitatif akan berbeda jika dibandingkan dengan jumlah aktivitas masing-masing jasad yang ditumbuhkan dalam medium yang sama tetapi terpisah.

Fenomena ini merupakan hasil interaksi metabolisme atau interaksi dalam penggunaan nutrisi yang dikenal sebagai sintropik atau sintropisme atau sinergistik. Sebagai contoh ialah mikroba penghasil metan yang anaerob obligat tidak dapat menggunakan glukosa sebagai substrat, tetapi mikroba tersebut akan segera tumbuh oleh adanya hasil metabolisme mikroba anaerob lain yang dapat menggunakan glukosa. Contoh lain ialah biakan campuran yang terdiri atas dua jenis mikroba atau lebih sering tidak memerlukan faktor tumbuh untuk pertumbuhannya. Mikroba yang dapat mensintesis bahan selnya dari senyawa organik sederhana dalam medium, akan mengekskresikan berbagai vitamin atau asam amino yang sangat penting untuk mikroba lainnya. Adanya ekskresi tersebut memungkinkan tumbuhnya mikroba lain. Kenyataan ini dapat menimbulkan koloni satelit yang dapat dilihat pada medium padat. Koloni satelit hanya dapat tumbuh kalau ada ekskresi dari mikroba lain yang menghasilkan faktor tumbuh esensial bagi mikroba tersebut.

Bentuk interaksi lain adalah *cross feeding* yang merupakan bentuk sederhana dari simbiose mutualistik. Dalam interaksi ini pertumbuhan jasad yang satu tergantung pada pertumbuhan jasad lainnya, karena kedua jasad tersebut saling memerlukan faktor tumbuh esensial yang diekskresikan oleh masing-masing jasad.

2.7. Pertumbuhan Populasi Mikroba

Suatu mikroba yang dimasukkan ke dalam medium baru yang sesuai akan tumbuh memperbanyak diri. Jika pada waktu-waktu tertentu jumlah mikroba dihitung dan dibuat grafik hubungan antara jumlah mikroba dengan waktu maka akan diperoleh suatu grafik atau kurva pertumbuhan. Pertumbuhan populasi mikrobial dibedakan menjadi dua yaitu biakan sistem tertutup (*batch culture*) dan biakan sistem terbuka (*continuous culture*).

Pada biakan sistem tertutup, pengamatan jumlah sel dalam waktu yang cukup lama akan memberikan gambaran berdasarkan kurva pertumbuhan bahwa terdapat fase-fase pertumbuhan. Fase pertumbuhan dimulai pada fase permulaan, fase pertumbuhan yang dipercepat, fase pertumbuhan logaritma (eksponensial), fase pertumbuhan yang mulai dihambat, fase stasioner maksimum, fase kematian dipercepat, dan fase kematian logaritma. Pada fase permulaan, mikroba baru menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru, sehingga sel belum membelah diri. Sel mikrobial mulai membelah diri pada fase pertumbuhan yang dipercepat, tetapi waktu generasinya masih panjang. Fase permulaan sampai fase pertumbuhan dipercepat sering disebut lag phase. Kecepatan sel membelah diri paling cepat terdapat pada fase pertumbuhan logaritma atau pertumbuhan eksponensial, dengan waktu generasi pendek dan konstan. Selama fase logaritma, metabolisme sel paling aktif, sintesis bahan sel sangat cepat dengan jumlah konstan sampai nutrisi habis atau terjadinya penimbunan hasil metabolisme yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan. Selanjutnya pada fase pertumbuhan yang mulai terhambat, kecepatan pembelahan sel berkurang dan jumlah sel yang mati mulai bertambah. Pada fase stasioner maksimum jumlah sel yang mati semakin meningkat sampai terjadi jumlah sel hidup hasil pembelahan sama dengan jumlah sel yang mati, sehingga jumlah sel hidup konstan, seolah-olah tidak terjadi pertumbuhan (pertumbuhan nol). Pada fase kematian yang dipercepat kecepatan kematian sel terus meningkat sedang kecepatan pembelahan sel nol, sampai pada fase kematian logaritma maka kecepatan kematian sel mencapai maksimal, sehingga jumlah sel hidup menurun dengan cepat seperti deret ukur. Walaupun demikian penurunan jumlah sel hidup tidak mencapai nol, dalam jumlah minimum tertentu sel mikrobial akan tetap bertahan sangat lama dalam medium tersebut.

Pertumbuhan dapat diamati dari meningkatnya jumlah sel atau massa sel (berat kering sel). Pada umumnya mikroba dapat memperbanyak diri dengan pembelahan biner, yaitu dari satu sel membelah menjadi 2 sel baru, maka pertumbuhan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel. Waktu yang diperlukan untuk membelah diri dari satu sel menjadi dua sel sempurna disebut waktu generasi.

Waktu yang diperlukan oleh sejumlah sel atau massa sel menjadi dua kali jumlah/massa sel semula disebut *doubling time* atau waktu penggandaan. Waktu penggandaan tidak sama antara berbagai mikrobia, dari beberapa menit, beberapa jam sampai beberapa hari tergantung kecepatan pertumbuhannya. Kecepatan pertumbuhan merupakan perubahan jumlah atau massa sel per unit waktu.

2.7.1. Penghitungan Waktu Generasi Mikroba

Seperti telah diuraikan di atas bahwa untuk regenerasi mikroba umumnya memperbanyak diri dengan pembelahan biner, yaitu dari satu sel membelah menjadi 2 sel baru. Jumlah sel akhir yang dihasilkan (N) pada generasi ke n dirumuskan Sri (2003) sebagaimana ditunjukkan pada Persamaan (2.1.) dan waktu generasinya yang dibutuhkan ditunjukkan pada Persamaan (2.2)

$$N = N_0 2^n \dots\dots\dots(2.1)$$

Dan

$$\text{Waktu Generasi} = t / n \dots\dots\dots(2.2)$$

Dimana :

- N = Jumlah sel akhir
- N₀ = Jumlah sel awal
- n = Jumlah generasi
- t = Waktu pertumbuhan eksponensial

Dalam bentuk logaritma, Persamaan (2.1) dapat ditulis sebagai Persamaan (2.3), yaitu :

$$\log N = \log N_0 + n \log 2 \dots\dots\dots(2.3)$$

atau

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0,301} \dots\dots\dots(2.4)$$

2.7.2. Pengukuran Pertumbuhan Mikroba

Pertumbuhan diukur dari perubahan jumlah sel atau berat kering massa sel. Jumlah sel dapat dihitung dari jumlah sel total yang tidak membedakan jumlah sel hidup atau mati, dan jumlah sel hidup (*viable count*). Jumlah total sel mikrobia dapat ditetapkan secara langsung

dengan pengamatan mikroskopis, dalam bentuk sampel kering yang diletakkan di permukaan gelas benda (*slide*) dan dalam sampel cairan yang diamati menggunakan metode counting chamber, misalnya dengan alat *Petroff-Hausser Bacteria Counter* (PHBC) untuk menghitung mikroba atau dengan alat haemocytometer untuk menghitung khamir, spora, atau sel-sel yang ukurannya relatif lebih besar dari mikroba.

Jumlah sel hidup dapat ditetapkan dengan metode plate count atau colony count, dengan cara ditaburkan pada medium agar sehingga satu sel hidup akan tumbuh membentuk satu koloni, jadi jumlah koloni dianggap setara dengan jumlah sel. Cara ini ada dua macam, yaitu metode taburan permukaan (*spread plate method*) dan metode taburan (*pour plate method*). Cara lain untuk menghitung jumlah sel hidup adalah 76 dengan filter membran dan MPN (*Most Probable Number*) yang menggunakan medium cair. Sampel mikrobial yang dihitung biasanya dibuat seri pengenceran.

2.8. Faktor Lingkungan untuk Pertumbuhan Mikroba

Aktivitas mikroba dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungannya. Perubahan lingkungan dapat mengakibatkan perubahan sifat morfologi dan fisiologi mikroba. Beberapa kelompok mikroba sangat resisten terhadap perubahan faktor lingkungan. Mikroba tersebut dapat dengan cepat menyesuaikan diri dengan kondisi baru tersebut. Faktor lingkungan meliputi faktor-faktor abiotik (fisika dan kimia), dan faktor biotik.

2.8.1. Faktor Biotik

2.8.1.1. Suhu

Pertumbuhan mikroba memerlukan kisaran suhu tertentu. Kisaran suhu pertumbuhan dibagi menjadi suhu minimum, suhu optimum, dan suhu maksimum. Berdasarkan kisaran suhu pertumbuhannya, mikroba dapat dikelompokkan menjadi mikroba psikrofil (kriofil), mesofil, dan termofil. Psikrofil adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 0 °C - 30 °C dengan suhu optimum sekitar 15 °C. Mesofil adalah kelompok mikroba pada umumnya, mempunyai suhu minimum 15 °C

suhu optimum 25 °C. -37° C. dan suhu maksimum 45 °C. -55 °C. Mikroba yang tahan hidup pada suhu tinggi dikelompokkan dalam mikroba termofil. Mikroba ini mempunyai membran sel yang mengandung lipida jenuh, sehingga titik didihnya tinggi. Selain itu dapat memproduksi protein termasuk enzim yang tidak terdenaturasi pada suhu tinggi. Di dalam DNA-nya mengandung guanin dan sitosin dalam jumlah yang relatif besar, sehingga molekul DNA tetap stabil pada suhu tinggi. Kelompok ini mempunyai suhu minimum 40 °C, optimum pada suhu 55 °C - 60 °C dan suhu maksimum untuk pertumbuhannya 75 °C. Untuk mikroba yang tidak tumbuh di bawah suhu 30 °C dan mempunyai suhu pertumbuhan optimum pada 60 °C, dikelompokkan kedalam mikroba termofil obligat. Untuk mikroba termofil yang dapat tumbuh di bawah suhu 30 °C, dimasukkan kelompok mikroba termofil fakultatif. Mikroba yang hidup di dalam tanah dan air, umumnya bersifat mesofil, tetapi ada juga yang dapat hidup di atas 50 °C (*termotoleran*). Contoh mikroba termotoleran adalah *Methylococcus capsulatus*. Contoh mikroba termofil adalah *Bacillus*, *Clostridium*, *Sulfolobus*, dan mikroba pereduksi sulfat/sulfur. Mikroba yang hidup di laut (*fotoτροφ*) dan mikroba besi (*Gallionella*) termasuk mikroba psikrofil.

Apabila mikroba dihadapkan pada suhu tinggi di atas suhu maksimum, akan memberikan beberapa macam reaksi, yaitu :

- Titik kematian thermal

Adalah suhu yang dapat mematikan spesies mikroba dalam waktu 10 menit pada kondisi tertentu.

- Waktu kematian thermal

Adalah waktu yang diperlukan untuk membunuh suatu spesies mikroba pada suatu suhu yang tetap. Faktor-faktor yang mempengaruhi titik kematian thermal ialah waktu, suhu, kelembaban, spora, umur mikroba, pH dan komposisi medium.

Apabila mikroba dihadapkan pada suhu rendah dapat menyebabkan gangguan metabolisme. Sebagai akibatnya akan terjadi :

- *Cold shock*

Penurunan suhu yang tiba-tiba menyebabkan kematian mikroba, terutama pada mikroba muda atau pada fase logaritmik.

- Pembekuan (*freezing*)

Rusaknya sel dengan adanya kristal es di dalam air intraseluler.

- Lyofilisasi

Adalah proses pendinginan dibawah titik beku dalam keadaan vakum secara bertingkat. Proses ini dapat digunakan untuk mengawetkan mikroba karena air protoplasma langsung diuapkan tanpa melalui fase cair (sublimasi).

2.8.1.2. Kandungan Air (Pengeringan)

Setiap mikroba memerlukan kandungan air bebas tertentu untuk hidupnya, biasanya diukur dengan parameter WA (*Water Activity*) atau kelembaban relatif. Mikroba umumnya dapat tumbuh pada WA 0,600 - 0,998. Mikroba umumnya memerlukan WA 0,900 - 0,999. Mikroba yang osmotoleran dapat hidup pada WA terendah (0,6) misalnya khamir *Saccharomyces rouxii*. *Aspergillus glaucus* dan jamur benang lain dapat tumbuh pada WA 0,8. Mikroba umumnya memerlukan aw atau kelembaban tinggi lebih dari 0,98, tetapi mikroba halofil hanya memerlukan WA 0,75. Mikroba yang tahan kekeringan adalah yang dapat membentuk spora, konidia atau dapat membentuk kista.

2.8.1.3. Tekanan Osmose

Tekanan osmose sebenarnya sangat erat hubungannya dengan kandungan air. Apabila mikroba diletakkan pada larutan hipertonis, maka selnya akan mengalami plasmolisis, yaitu terkelupasnya membran sitoplasma dari dinding sel akibat mengkerutnya sitoplasma. Apabila diletakkan pada larutan hipotonis, maka sel mikroba akan mengalami plasmoptisa, yaitu pecahnya sel karena cairan masuk ke dalam sel, sel membengkak dan akhirnya pecah.

Berdasarkan tekanan osmose yang diperlukan dapat dikelompokkan menjadi (1) mikroba osmofil, adalah mikroba yang dapat tumbuh pada kadar gula tinggi, (2) mikroba halofil, adalah mikroba yang dapat tumbuh pada kadar garam halogen yang tinggi, (3) mikroba halodurik, adalah kelompok mikroba yang dapat tahan (tidak mati) tetapi tidak dapat tumbuh pada kadar garam tinggi, kadar garamnya dapat mencapai 30 %. Contoh mikroba osmofil adalah beberapa jenis khamir. Khamir osmofil mampu tumbuh pada larutan gula dengan

konsentrasi lebih dari 65 % wt/wt (WA = 0,94). Contoh mikroba halofil adalah mikroba yang termasuk Archaeobacterium, misalnya Halobacterium. Mikroba yang tahan pada kadar garam tinggi, umumnya mempunyai kandungan KCl yang tinggi dalam selnya. Selain itu mikroba ini memerlukan konsentrasi Kalium yang tinggi untuk stabilitas ribosomnya. Mikroba halofil ada yang mempunyai membran purple bilayer, dinding selnya terdiri dari murein, sehingga tahan terhadap ion Natrium.

2.8.1.4. Ion-ion dan Listrik

a. Kadar ion hidrogen (pH)

Mikroba umumnya menyukai pH netral (pH 7). Beberapa mikroba dapat hidup pada pH tinggi (medium alkalin). Contohnya adalah mikroba nitrat, rhizobia, actinomycetes, dan mikroba pengguna urea. Hanya beberapa mikroba yang bersifat toleran terhadap kemasaman, misalnya Lactobacilli, Acetobacter, dan Sarcina ventriculi. Mikroba yang bersifat asidofil misalnya Thiobacillus. Jamur umumnya dapat hidup pada kisaran pH rendah. Apabila mikroba ditanam pada media dengan pH 5 maka pertumbuhan didominasi oleh jamur, tetapi apabila pH media 8 maka pertumbuhan didominasi oleh mikroba. Berdasarkan pH-nya mikroba dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu :

- Mikroba asidofil : Kelompok mikroba yang dapat hidup pada pH 2,0-5,0
- Mikroba mesofil (neutrofil) : Kelompok mikroba yang dapat hidup pada pH 5,5-8,0
- Mikroba alkalifil : Kelompok mikroba yang dapat hidup pada pH 8,4-9,5.

b. Buffer

Untuk menumbuhkan mikroba pada media memerlukan pH yang konstan, terutama pada mikroba yang dapat menghasilkan asam. Misalnya Enterobacteriaceae dan beberapa Pseudomonadaceae. Oleh karenanya ke dalam medium diberi tambahan buffer untuk menjaga agar pH nya konstan. Buffer merupakan campuran

garam mono dan dibasik, maupun senyawa-senyawa organik amfoter. Sebagai contoh adalah buffer fosfat anorganik dapat mempertahankan pH diatas 7,2. Cara kerja buffe adalah garam dibasik akan mengadsorbsi ion H^+ dan garam monobasik akan bereaksi dengan ion OH^- .

c. Ion-ion lain

Logam berat seperti Hg, Ag, Cu, Au, dan Pb pada kadar rendah dapat bersifat meracun (toksis). Logam berat mempunyai daya oligodinamik, yaitu daya bunuh logam berat pada kadar rendah. Selain logam berat, ada ion-ion lain yang dapat mempengaruhi kegiatan fisiologi mikroba, yaitu ion sulfat, tartrat, klorida, nitrat, dan benzoat. Ion-ion tersebut dapat mengurangi 84 pertumbuhan mikroba tertentu. Oleh karena itu sering digunakan untuk mengawetkan suatu bahan, misalnya digunakan dalam pengawetan makanan. Ada senyawa lain yang juga mempengaruhi fisiologi mikroba, misalnya asam benzoat, asam asetat, dan asam sorbat.

d. Listrik

Listrik dapat mengakibatkan terjadinya elektrolisis bahan penyusun medium pertumbuhan. Selain itu arus listrik dapat menghasilkan panas yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba. Sel mikroba dalam suspensi akan mengalami elektroforesis apabila dilalui arus listrik. Arus listrik tegangan tinggi yang melalui suatu cairan akan menyebabkan terjadinya shock karena tekanan hidrolis listrik. Kematian mikroba akibat shock terutama disebabkan oleh oksidasi. Adanya radikal ion dari ionisasi radiasi dan terbentuknya ion logam dari elektroda juga menyebabkan kematian mikroba.

2.8.1.5. Radiasi

Radiasi menyebabkan ionisasi molekul-molekul di dalam protoplasma. Cahaya umumnya dapat merusak mikroba yang tidak mempunyai pigmen fotosintesis. Cahaya mempunyai pengaruh germisida, terutama cahaya bergelombang pendek dan bergelombang panjang. Pengaruh germisida dari sinar bergelombang panjang disebabkan oleh panas yang ditimbulkannya, misalnya sinar inframerah. Sinar x

(0,005 A° - 1,0 A°), Sinar ultra violet (2950 A° - 4000 A°), dan sinar radiasi lain dapat membunuh mikroba. Apabila tingkat iradiasi yang diterima sel mikroba rendah, maka dapat menyebabkan terjadinya mutasi pada mikroba.

2.8.1.6. Tegangan Permukaan

Tegangan muka mempengaruhi cairan sehingga permukaan cairan tersebut menyerupai membran yang elastis. Seperti telah diketahui protoplasma mikroba terdapat di dalam sel yang dilindungi dinding sel, maka apabila ada perubahan tegangan muka dinding sel akan mempengaruhi pula permukaan protoplasma. Akibat selanjutnya dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba dan bentuk morfologinya. Zat-zat seperti sabun, deterjen, dan zat-zat pembasah (surfaktan) seperti Tween dan Triton dapat mengurangi tegangan muka cairan/larutan. Umumnya mikroba cocok pada tegangan muka yang relatif tinggi.

2.8.1.7. Tekanan Hidrostatik

Tekanan hidrostatik mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan mikroba. Umumnya tekanan 1 atm - 400 atm tidak mempengaruhi atau hanya sedikit mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan mikroba. Tekanan hidrostatik yang lebih tinggi lagi dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan, oleh karena tekanan hidrostatik tinggi dapat menghambat sintesis RNA, DNA, dan protein, serta mengganggu fungsi transport membran sel maupun mengurangi aktivitas berbagai macam enzim. Tekanan diatas 100.000 pound/inchi² menyebabkan denaturasi protein. Akan tetapi ada mikroba yang tahan hidup pada tekanan tinggi (mikroba barotoleran), dan ada mikroba yang tumbuh optimal pada tekanan tinggi sampai 16.000 pound/inchi² (barofil). Mikroba yang hidup di laut dalam umumnya adalah barofilik atau barotoleran. Sebagai contoh adalah mikroba *Spirillum*.

2.8.1.8. Getaran

Getaran mekanik dapat merusakkan dinding sel dan membran sel mikroba. Oleh karena itu getaran mekanik banyak dipakai untuk memperoleh ekstrak sel mikroba. Isi sel dapat diperoleh dengan cara

menggerus sel-sel dengan menggunakan abrasif atau dengan cara pembekuan kemudian dicairkan berulang kali. Getaran suara 100-10.000 kali/ detik juga dapat digunakan untuk memecah sel.

2.8.2. Faktor Biotik

Di alam jarang sekali ditemukan mikroba yang hidup sebagai biakan murni, tetapi selalu berada dalam asosiasi dengan jasad-jasad lain. Antar jasad dalam satu populasi atau antar populasi jasad yang satu dengan yang lain saling berinteraksi.

2.8.2.1. Interaksi Dalam Satu Populasi Mikroba

Interaksi antar jasad dalam satu populasi yang sama ada dua macam, yaitu interaksi positif maupun negatif. Interaksi positif menyebabkan meningkatnya kecepatan pertumbuhan sebagai efek sampingnya. Meningkatnya kepadatan populasi, secara teoritis meningkatkan kecepatan pertumbuhan. Interaksi positif disebut juga kooperasi. Sebagai contoh adalah pertumbuhan satu sel mikroba menjadi koloni atau pertumbuhan pada fase lag (fase adaptasi). Interaksi negatif menyebabkan turunnya kecepatan pertumbuhan dengan meningkatnya kepadatan populasi. Misalnya populasi mikroba yang ditumbuhkan dalam substrat terbatas, atau adanya produk metabolik yang beracun. Interaksi negatif disebut juga kompetisi. Sebagai contoh jamur *Fusarium* dan *Vorticillium* pada tanah sawah, dapat menghasilkan asam lemak dan H_2S yang bersifat meracun.

2.8.2.2. Interaksi antar Berbagai Macam Populasi Mikroba

Apabila dua populasi yang berbeda berasosiasi, maka akan timbul berbagai macam interaksi. Interaksi tersebut menimbulkan pengaruh positif, negatif, ataupun tidak ada pengaruh antar populasi mikroba yang satu dengan yang lain. Nama masing-masing interaksi adalah sebagai berikut :

- Netralisme

Netralisme adalah hubungan antara dua populasi yang tidak saling mempengaruhi. Hal ini dapat terjadi pada kepadatan

populasi yang sangat rendah atau secara fisik dipisahkan dalam mikrohabitat, serta populasi yang keluar dari habitat alamiahnya.

- Komensalisme

Hubungan komensalisme antara dua populasi terjadi apabila satu populasi diuntungkan tetapi populasi lain tidak terpengaruh

- Sinergisme (protokooperasi)

Suatu bentuk asosiasi yang menyebabkan terjadinya suatu kemampuan untuk dapat melakukan perubahan kimia tertentu di dalam substrat. Apabila asosiasi melibatkan 2 populasi atau lebih dalam keperluan nutrisi bersama, maka disebut sintropisme. Sintropisme sangat penting dalam peruraian bahan organik tanah, atau proses pembersihan air secara alami.

- Mutualisme (simbiosis)

Mutualisme adalah asosiasi antara dua populasi mikroba yang keduanya saling tergantung dan sama-sama mendapat keuntungan. Mutualisme sering disebut juga simbiosis. Simbiosis bersifat sangat spesifik (khusus) dan salah satu populasi anggota simbiosis tidak dapat digantikan tempatnya oleh spesies lain yang mirip.

- Kompetisi

Hubungan negatif antara 2 populasi mikroba yang keduanya mengalami kerugian. Peristiwa ini ditandai dengan menurunnya sel hidup dan pertumbuhannya. Kompetisi terjadi pada 2 populasi mikroba yang menggunakan nutrisi/makanan yang sama, atau dalam keadaan nutrisi terbatas

- Amensalisme (antagonisme)

Satu bentuk asosiasi antar spesies mikroba yang menyebabkan salah satu pihak dirugikan, pihak lain diuntungkan atau tidak terpengaruh apapun. Umumnya merupakan cara untuk melindungi diri terhadap populasi mikroba lain

- Predasi

Hubungan predasi terjadi apabila satu organisme predator memangsa atau memakan dan mencerna organisme lain (*prey*).

Umumnya predator berukuran lebih besar dibandingkan *prey*, dan peristiwanya berlangsung cepat.

- Parasitisme

Parasitisme terjadi antara dua populasi, populasi satu diuntungkan (parasit) dan populasi lain dirugikan (*host* / inang). Umumnya parasitisme terjadi karena keperluan nutrisi dan bersifat spesifik. Ukuran parasit biasanya lebih kecil dari inangnya. Terjadinya parasitisme memerlukan kontak secara fisik maupun metabolik serta waktu kontak yang relatif lama.

2.9. Mikrohabitat Dalam Struktur Tanah

Di setiap tempat seperti dalam tanah, udara maupun air selalu dijumpai mikroba. Umumnya jumlah mikroba dalam tanah lebih banyak daripada dalam air ataupun udara. Umumnya bahan organik dan senyawa anorganik lebih tinggi dalam tanah sehingga cocok untuk pertumbuhan mikroba heterotrof maupun autotrof.

Keberadaan mikroba di dalam tanah terutama dipengaruhi oleh sifat kimia dan fisika tanah. Komponen penyusun tanah yang terdiri atas pasir, debu, lempung dan bahan organik akan membentuk struktur tanah. Struktur tanah akan menentukan keberadaan oksigen dan lengas dalam tanah. Dalam hal ini akan terbentuk lingkungan mikro dalam suatu struktur tanah. Mikroba akan membentuk mikrokoloni dalam struktur tanah tersebut, dengan tempat pertumbuhan yang sesuai dengan sifat mikroba dan lingkungan yang diperlukan. Dalam suatu struktur tanah dapat dijumpai berbagai mikrokoloni seperti mikroba heterotrof pengguna bahan organik maupun mikroba autotrof, dan mikroba aerob maupun anaerob. Untuk kehidupannya, setiap jenis mikroba mempunyai kemampuan untuk merubah satu senyawa menjadi senyawa lain dalam rangka mendapatkan energi dan nutrien. Dengan demikian adanya mikroba dalam tanah menyebabkan terjadinya daur unsur-unsur seperti karbon, nitrogen, fosfor dan unsur lain di alam.

2.10. Peranan dan Penggunaan Mikroba

Mikroba di alam secara umum berperan sebagai produsen, konsumen, maupun redusen. Jasad produsen menghasilkan bahan

organik dari bahan anorganik dengan energi sinar matahari. Mikroba yang berperanan sebagai produsen adalah algae dan mikroba fotosintetik. Jasad konsumen menggunakan bahan organik yang dihasilkan oleh produsen. Contoh mikroba konsumen adalah protozoa. Jasad redusen menguraikan bahan organik dan sisa-sisa jasad hidup yang mati menjadi unsur-unsur kimia (mineralisasi bahan organik), sehingga di alam terjadi siklus unsur-unsur kimia. Contoh mikroba redusen adalah mikroba dan jamur (fungi).

Suatu bahan yang ditumbuhi oleh mikroba akan mengalami perubahan susunan kimianya. Perubahan kimia yang terjadi ada yang dikenal sebagai fermentasi (pengkhamiran) dan pembusukan (*putrefaction*). Fermentasi merupakan proses yang menghasilkan alkohol atau asam organik, misalnya terjadi pada bahan yang mengandung karbohidrat. Pembusukan merupakan proses peruraian yang menghasilkan bau busuk, seperti pada peruraian bahan yang mengandung protein. Berikut ni adalah beberapa contoh dari penggunaan mikroba, antara lain yaitu :

- Penggunaan mikroba untuk proses-proses klasik, seperti khamir untuk membuat anggur dan roti, mikroba asam laktat untuk yogurt dan kefir, mikroba asam asetat untuk vinegar, jamur *Aspergillus sp* untuk kecap, dan jamur *Rhizopus sp* untuk tempe.
- Penggunaan mikroba untuk produksi antibiotik, antara lain penisilin oleh jamur *Penicillium sp* dan streptomisin oleh *actinomyses* *Streptomyces sp*.
- Penggunaan mikroba untuk proses-proses baru, misalnya karotenoid dan steroid oleh jamur, asam glutamat oleh mutan *Corynebacterium glutamicum*, pembuatan enzim amilase, proteinase, pektinase, dan lain-lain.
- Penggunaan mikroba dalam teknik genetika modern, seperti untuk pemindahan gen dari manusia, binatang, atau tumbuhan ke dalam sel mikrobial, penghasilan hormon, antigen, antibodi, dan senyawa lain misalnya insulin, interferon, dan lain-lain.
- Penggunaan mikroba di bidang pertanian, misalnya untuk pupuk hayati (biofertilizer), biopestisida, pengomposan, dan sebagainya.

- Penggunaan mikroba di bidang pertambangan, seperti untuk proses leaching di tambang emas, desulfurisasi batubara, maupun untuk proses penambangan minyak bumi.
- Penggunaan mikroba di bidang lingkungan, misalnya untuk mengatasi pencemaran limbah organik maupun anorganik termasuk logam berat dan senyawa xenobiotik.

2.11. Microbial Enhanced Oil Recovery

MEOR adalah singkatan dari *Microbial Enhanced Oil Recovery*, atau peningkatan perolehan minyak dengan mikroba. MEOR adalah suatu teknologi berbasis biologi dengan cara memanipulasi fungsi atau struktur atau kedua-duanya dari lingkungan *microbial existing* pada tambang minyak. (*oil reservoirs*). Penggunaan proses MEOR pada penambangan minyak bertujuan untuk meningkatkan hasil minyak yang dapat ditambang (Banat, 1995; Clark et al., 1981 and Stosur, 1991). Proses peningkatan yang dilakukan dengan MEOR adalah dengan menurunkan jumlah minyak yang terperangkap di media yang porus (Fujiwara, 2004; Olliver et al., 2005, Van Hamme et al., 2006; Lazar et al, 2007 and Sen, 2008). MEOR digunakan sebagai teknologi ketiga yang dapat menurunkan jumlah minyak yang terperangkap dalam media yang porus menjadi sepertiganya sehingga menaikkan jumlah minyak yang dapat ditambang (Sen, 2008). Aktivitas mikroba dalam MEOR dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada minyak berat menjadi minyak yang lebih ringan, atau dapat juga menyebabkan desulfurisasi atau denitrifikasi yang dapat membuang logam berat yang terkandung dalam minyak.

Pada tahun 1930-an, orang mulai memahami korelasi antara mikroba dan minyak bumi, namun saat itu peran mikroba dianggap merugikan proses penambangan minyak. Kemudian pada tahun 1946, ZoBell melakukan eksperimen pelepasan minyak dari endapan pasir aspal di Athabaska, Amerika Serikat. Akhirnya diketahui bahwa mikroba tertentu dapat digunakan untuk meningkatkan produksi minyak. Sejak saat itu (1947) MEOR mulai dikembangkan secara intensif, tetapi baru dilakukan pengembangan secara besar-besaran di 15 negara sejak krisis minyak pada tahun 1970-an. Pada era 1970-1983, pengembangan teknologi MEOR difokuskan pada mikroba lingkungan

(*microbial ecology*) dan pengkarakterisasian tambang minyak (*oil reservoirs*). Baru pada 1990, MEOR mendapat pengakuan sebagai teknologi yang merupakan keterpaduan antar multi disiplin ilmu (*interdisciplinary technology*). Survey yang dilakukan pada tahun 1995 pada 322 proyek di USA yang menggunakan MEOR menunjukkan bahwa 81% dari proyek-proyek tersebut berhasil meningkatkan produksi minyaknya (Lazar et al, 2007). Pada tahun 2010, penggunaan MEOR mendapat perhatian sangat besar sehubungan dengan tingginya harga dan mulai langkanya sumber-sumber minyak (Lazar et al, 2007 and Sen, 2008).

Dalam proses MEOR, mikroba MEOR menghasilkan biosurfaktan dan gas hasil metabolisme yang membantu mendorong gas CO yang beracun ke luar sumur minyak. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba hidrokarbonoklastik berfungsi antara lain, yaitu :

- Menurunkan viskositas (kekentalan/ kesulitan untuk mengalir)
- Menurunkan tegangan permukaan
- Meningkatkan kelarutan CO dalam air
- Meningkatkan fluiditas (aliran) CO keluar sumur
- Mengubah porositas batuan. Pori batuan yang terlalu besar dapat "disumbat" secara selektif dengan biosurfaktan sehingga ukurannya mengecil. Penurunan volume pori akan meningkatkan tekanan sehingga CO dapat keluar dengan lebih mudah.

Untuk melakukan fungsi-fungsi tersebut, terdapat beberapa karakteristik yang harus dimiliki oleh mikroba MEOR, yaitu mampu mengolah senyawa hidrokarbon, menghasilkan biosurfaktan, menghasilkan gas, ukuran kecil, Barofilik (kuat terhadap tekanan tinggi), termofilik (kuat terhadap suhu tinggi), halofilik, dan indigen (berasal dari lingkungan lokasi penambangan minyak tersebut, bukan mikroba asing). Selain itu, mikroba yang digunakan harus tidak patogen (berbahaya bagi manusia).

Dalam penerapan teknologi MEOR, ada beberapa hambatan alam yang perlu diperhatikan. Beberapa hambatan tersebut antara lain adalah :

- Temperatur
- Tekanan

- Harus ada interkoneksi pori (diameter pori minimal 0,2 mikron)
- PH
- Muatan permukaan (surface charge)
- Aktivitas enzim
- Dan lain sebagainya

Jenis mikroba yang digunakan pada teknologi MEOR tergantung pada tujuan dari pengaplikasian teknologi itu sendiri. Sen, 2008, memberikan kemungkinan-kemungkinan aplikasi dan jenis mikroba yang digunakan sebagai agen MEOR, yaitu seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Kemungkinan Pengaplikasian MEOR dan Jenis Mikroba yang Digunakan (Sen, 2008)

MEOR agents	Microbes	Product	Possible MEOR application
Biomass, i.e. flocks or biofilms	Bacillus sp.	Cells and EPS (mainly exopolysaccharides),	Selective plugging of oil depleted zones and wettability angle alteration
	Leuconostoc		
	Xanthomonas		
Surfactants	Acinetobacter	Emulsan and alasan	Emulsification and de-emulsification through reduction of interfacial tension
	Bacillus sp.	Surfactin, rhamnolipid, lichenysin	
	Pseudomonas	Rhamnolipid, glycolipids	
	Rhodococcus sp.	Viscosin and trehaloselipids	
	Arthrobacter		
Biopolymers	Xanthomonas sp.	Xanthan gum	Injectivity profile and viscosity modification, selective plugging
	Aureobasidium sp.	Pullulan	
	Bacillus sp.	Levan	
	Alcaligeness sp.	Curdlan	

MEOR agents	Microbes	Product	Possible MEOR application
	Leuconostoc sp.	Dextran	
	Sclerotium sp.	Scleroglucan	
	Brevibacterium		
Solvents	Clostridium	Acetone, butanol, propan-2-diol	Rock dissolution for increasing permeability, oil viscosity reduction
	Zymomonas and Klebsiella		
Acids	Clostridium	Propionic and butyric acids	Permeability increase, emulsification
	Enterobacter		
	Mixed acidogens		
Gases	Clostridium	Methane and hydrogen	Increased pressure, oil swelling, reduction of interfacial section and viscosity; increase permeability
	Enterobacter		
	Methanobacterium		

SURFAKTAN DAN BIOSURFAKTAN

Kebutuhannya diperkirakan akan semakin meningkat dalam 10 tahun ke depan. Kebutuhan aspal tidak hanya untuk kebutuhan penutupan jalan namun juga untuk atap bangunan, coating, dan lain-lain. Hampir semua aspal yang tersedia saat ini adalah merupakan produk samping dari pemrosesan minyak bumi menjadi aftur, bensin, minyak tanah, dan fraksi-fraksi lain yang diekstrak dari minyak mentah.

Pemanfaatan asbuton dari tahun ke tahun terus mengalami peningkatan sejalan dengan pemenuhan peningkatan kebutuhan akan aspal. Saat ini jenis asbuton yang telah digunakan secara besar-besaran baru terbatas pada jenis asbuton butir (granular) dan asbuton pracampur. Dalam campuran beraspal, kuantitas penggunaan asbuton dari kedua jenis ini masih sangat sedikit yaitu maksimum hanya mencapai 20% tergantung jenis asbuton yang digunakan. Untuk mengoptimalkan penggunaan asbuton dalam campuran beraspal, penelitian untuk menghasilkan asbuton murni

melalui proses ekstraksi telah dilakukan. Dalam proses ini, pemisahan bitumen asbuton dengan mineralnya dilakukan dengan menggunakan miniplant berbagai jenis pelarut. Sejauh ini hasilnya cukup menggembirakan walaupun *mass production* belum dapat dilakukan. Alternatif lainnya dalam proses ekstraksi ini adalah dengan menggunakan mikro organism (mikroba).

Proses ekstraksi aspal umumnya menggunakan cara fisika dan kimiawi yakni kombinasi antara penggunaan pelarut organik seperti Trichloethylene (TCE) dan suhu tinggi serta proses mekanik. Kombinasi dari cara fisika dan kimiawi ini melahirkan metoda ekstraksi konvensional yang umum digunakan selama ini, yakni refluks, sentrifugal, dan vacuum. Sejauh ini, metode-metode ini mungkin sudah merupakan metode terbaik, namun demikian masih memiliki kelemahan-kelemahan. Penggunaan TCE, TCA (Trichloroethane) maupun d-Limonene sebagai pelarut kimia pada proses ekstraksi aspal dapat membahayakan kesehatan karena bahan pelarut tersebut masuk dalam kategori senyawa hazardous yang bersifat karsinogenik. Meskipun pengembangan metode dengan pelarut seperti nPB (n-Propyl Bromide) sudah lebih aman dari pelarut sebelumnya, namun pelarut berbasis bromide adalah termasuk tidak ramah lingkungan karena dapat merusak lapisan ozon di atmosfer. Pelarut nPB sendiri meskipun lebih aman dari pelarut terklorinasi (TCE dan TCA) namun tetap membahayakan karena dapat mengiritasi mata dan kulit serta dapat menyebabkan sakit kepala dan mual.

Aspal pada dasarnya merupakan senyawa organik yang secara alamiah dapat terurai secara proses biologis (mikrobiologis) di alam. Buktinya aspal yang dipakai menutup jalan dapat terkikis mengalami kerusakan dan pecah di berbagai lokasi jalan raya. Tempat-tempat terjadi kerusakan jalan biasanya pada lokasi yang tergenang air atau kondisi lembab di bawah naungan pohon. Tempat-tempat seperti ini merupakan habitat yang ideal bagi pertumbuhan mikroba hidrokarbonoklastik, yakni kelompok mikroba yang dapat memanfaatkan senyawa hidrokarbon penyusun aspal.

Aspal merupakan senyawa organik hidrokarbon kompleks bagian dari minyak bumi dan batu bara yang mengandung senyawa alifatik dan aromatic jenuh dan tak jenuh dengan kandungan mencapai 150 atom C. Komposisi aspal sangat bervariasi tergantung dari sumber minyak mentah atau batu baranya. Pada umumnya aspal mengandung unsur-unsur utama selain karbon seperti oksigen, nitrogen, sulfur, dan hidrogen. Kandungan karbon adalah yang tertinggi mencapai 80%, hydrogen 10%, sulfur 6%, dan sisanya adalah unsur nitrogen dan oksigen serta logam seperti besi, nikel, dan vanadium.

keberadaan unsur-unsur tersebut dalam aspal membuka peluang untuk mengekstraksi aspal secara mikrobiologis dengan menggunakan peran mikroba. Hal ini disebabkan karena mikroba dari kelompok hidrokarbonoklastik umumnya dapat menghasilkan senyawa surfaktan (biosurfaktan) yang memungkinkan untuk melepaskan aspal dari ikatan bebatuan.

Biosurfaktan adalah hasil ekskresi (*excretion*) mikro organisme yang memiliki sifat mirip dengan surfaktan (Thavasi et al., 2009). Penggunaan surfaktan tidak selamanya dapat meningkatkan degradasi minyak bumi. Surfaktan sintetis dilaporkan dapat menurunkan tingkat degradasi dari senyawa organik, yang kemungkinan disebabkan oleh efek toksik yang ditimbulkannya (Christofi et al., 2002). Sehingga penggunaan biosurfaktan yang memiliki toksisitas relatif lebih rendah dibanding surfaktan sintetis (Kosaric, 1992), dan lebih mudah terurai saat ini menjadi pilihan yang sangat menarik (Christofi dan Ivshina, 2002).

3.1. Surfaktan

Surfaktan adalah molekul amphipatik yang terdiri atas gugus hidrofilik dan hidrofobik, sehingga dapat berada di antara cairan yang memiliki sifat polar dan ikatan hidrogen yang berbeda, seperti minyak dan air. Hal ini menyebabkan surfaktan mampu mereduksi

tegangan permukaan dan membentuk mikroemulsi sehingga hidrokarbon dapat larut di dalam air dan sebaliknya.

Surfaktan memegang peranan penting dalam berbagai aplikasi praktis dan produksi deterjen, emulsifier, cat, tinta, untuk formulasi herbisida dan insektisida dalam bidang argokimia, serta industri kosmetik. Karakteristik surfaktan yang mampu berfungsi sebagai detergen, pengemulsi, *foaming* dan pendispersi, menjadikan surfaktan banyak digunakan dalam proses kimia (Desai et al., 1997). Dalam bidang teknik 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.

Penggunaan surfaktan pada proses *recovery* minyak bumi tidak selamanya dapat meningkatkan degradasi minyak bumi tersebut. Surfaktan sintetis dilaporkan dapat menurunkan tingkat degradasi dari senyawa organik, yang kemungkinan disebabkan oleh efek toksik yang ditimbulkannya (Christofi et al., 2002). Penggunaan biosurfaktan yang motabene memiliki toksisitas relatif lebih rendah dibanding surfaktan sintetis (Kosaric, 1992), dan lebih mudah terurai saat ini menjadi pilihan yang sangat menarik (Christofi et al. 2002).

3.2. Biosurfaktan

Surfaktan mikroba atau biosurfaktan adalah molekul permukaan-aktif (*surface active molecules*) yang berasal dari sejumlah mikroba. Biosurfaktan adalah hasil ekskresi mikroba yang memiliki sifat mirip dengan surfaktan (Thavasi et al., 2009). Biosurfaktan merupakan surfaktan yang disintesis oleh mikroba, terutama jika ditumbuhkan pada substrat yang tidak larut dalam air.

Beberapa mikroba mampu untuk memanfaatkan hidrokarbon sebagai satu-satunya sumber karbon. Walaupun begitu, ada masalah yang dihadapi oleh mikroba tersebut yaitu hidrokarbon adalah substrat atau senyawa yang tidak larut dalam air. Sehingga

untuk memanfaatkan hidrokarbon, mikroba harus melakukan upaya sendiri yaitu dengan menghasilkan biosurfaktan. Mikroba-mikroba seperti ini menggunakan media (substrat) hidrokarbon untuk perkembangan dan metabolisme (Zajic et al., 1977). Mikroba-mikroba ini menghasilkan senyawa permukaan-aktif yang memiliki kemampuan untuk mengurangi tegangan permukaan dan tegangan pada *interface* dua fase cair (Palashpriya et al., 2008).

Biosurfaktan yang dihasilkan oleh sel mikroba dapat terdistribusi dalam tiga tempat utama (Kosaric et al., 1987), yaitu :

1. Di dalam sel (intraseluler), termasuk biosurfaktan yang terdapat pada membran lipid dan lipid intraseluler, baik padat ataupun cair.
2. Di luar sel (ekstraseluler), umumnya biosurfaktar ekstraseluler terkumpul dalam bentuk misel (butiran-butiran) atau pada interface air-udara.
3. Biosurfakatan yang terdapat pada permukaan sel, termasuk lipid sederhana, lipid kompleks, lipid campuran dan biosurfakatan yang terabsorpsi pada permukaan sel.

Biosurfaktan yang dikeluarkan oleh sel mikroba selanjutnya dapat berasosiasi dengan senyawa hidrokarbon sedemikianhingga senyawa tersebut menjadi dapat larut dalam air. Namun demikian, ada beberapa jenis mikroba yang dapat menghasilkan biosurfaktan dengan tanpa memerlukan hidrokarbon sebagai sumber karbonnya, contohnya *Bacillus subtilis* (Zajic et al, 1977). Walaupun begitu, kenyataannya tidak semua mikroba dapat menghasilkan biosurfaktan.

Biosurfaktan merupakan lipid atau turunan, baik berupa lipid sederhana ataupun lipid kompleks yang dihasilkan oleh mikroba selama pertumbuhannya (Kasarić et al. 1987). Menurut Van Dyke et al. (1991), biosurfaktan merupakan senyawa amfipatik. Ini berarti bahwa biosurfaktan mengandung kelompok hidrofobik

atau lipophilik (ekor) yang bersifat non polar dan kelompok hidrophilik (kepala) yang bersifat polar. Oleh karena itu, molekul biosurfaktan mengandung bahan yang tidak larut dalam air (*water insoluble*) tetapi larut dalam minyak (*soluble*).

Bagian dari biosurfaktan yang bersifat hidrophilik merupakan molekul yang bersifat polar. Molekul ini dapat berupa karbohidrat, asam amino atau kelompok fosfat. Sedangkan bagian yang bersifat hidrophobik umumnya merupakan karbon rantai panjang atau karbon radikal yang mengandung 10-20 atom karbon. Berdasarkan muatan di kepalanya (bagian hidrophiliknya), biosurfaktan dapat bersifat anionik, kationik, zwitterionik (bersifat anionik dan kationik) ataupun bersifat nonionik.

Tidak seperti surfaktan berbahan dasar minyak, biosurfaktan tidak diklasifikasikan berdasarkan grup polar natural-nya, tetapi berdasarkan struktur kimia dan mikroba penghasilnya. Pada umumnya, struktur kimiawi biosurfaktan terdiri atas gugus hidrofilik yang mengandung asam amino atau anion dan kation peptida, mono-, di-, atau polisakarida; dan gugus hidrofobik yang mengandung asam lemak jenuh dan tak jenuh.

Berdasarkan strukturnya, biosurfaktan diklasifikasikan sebagai glikolipid; lipopeptida atau lipoprotein; asam lemak, fosfolipid, biosurfaktan polimerik; dan biosurfaktan partikulat.

Berdasarkan ukuran molekularnya, biosurfaktan dapat dibagi menjadi biosurfaktan dengan berat molekul rendah dan berat molekul tinggi. Glikolipid seperti rhamnosa dan sophorolipid, dan lipopeptida seperti surfactin dan polymyxin merupakan biosurfaktan dengan berat molekul rendah, yang berfungsi menurunkan tegangan permukaan dan tegangan antar permukaan. Sedangkan biosurfaktan dengan berat molekul tinggi seperti lipoprotein, lipopolisakarida, dan amphipatik polisakarida sangat efektif untuk menstabilkan emulsi minyak dalam air.

Biosurfaktan memiliki aplikasi yang menarik karena sifat-sifat fungsionalnya yang luas termasuk didalamnya kemampuan dalam

pembersihan, pembasahan, pembuihan, emulsifikasi, reduksi viskositas, pemisahan dan pelarutan. Dengan kemampuan tersebut, biosurfaktan banyak dimanfaatkan dalam industri pembersih, pertanian, konstruksi, pangan, kertas, industri logam, tekstil, kosmetik, farmasi dan industri petrokimia termasuk dalam aplikasi di lingkungan untuk bioremediasi. Biosurfaktan memiliki kelebihan karena mudah didegradasi, toksisitasnya rendah, dan dapat dihasilkan dari substrat yang bernilai ekonomi rendah ataupun limbah (Banat et al., 2000).

Biosurfaktan dapat diproduksi dengan menggunakan berbagai macam bahan baku berbasis agro. Bahan ini sangat murah sehingga biosurfaktan yang dihasilkan memiliki keunggulan secara komersial dibandingkan surfaktan sintetis dimana biosurfaktan tidak bersifat toksin (racun) terhadap lingkungan (Neu, 1996), lebih efektif dan ramah lingkungan dibandingkan dengan surfaktan sintetis. Selain itu, biosurfaktan lebih stabil pada temperatur, PH dan salinitas yang tinggi. Sifat-sifat ini merupakan sifat yang diinginkan untuk surfaktan yang akan digunakan untuk berbagai proses industri seperti seperti dalam pengolahan makanan, formulasi farmasi, dan *enhanced oil recovery* dan dalam bioremediasi lingkungan. Dengan sifatnya ini, biosurfaktan merupakan alternatif potensial pengganti surfaktan kimia pengaktif permukaan (Van Dyke et al., 1991).

Produksi biosurfaktan dapat dihasilkan secara maksimal bila dibiakan pada medium pertumbuhan dan kondisi lingkungan optimal (Sen, 1997; Sen et al., 2004). Suatu terobosan yang dilakukan untuk peningkatan produksi telah dilakukan dengan menggunakan hiper-production recombinant dan varietas mutan (Mukherjee et al., 2006).

Biosurfaktan memiliki berbagai struktur kimia seperti lipopeptides (Lee et al., 2007); flavolipids (Bodour et al., 2004), polimerik dan partikulat (Shabtai, 1990; Panilaitis et al., 2006 Franzetti et al., 2008). Molekul-molekul ini diproduksi oleh mikroba dan jamur (Vance-Harrop et al., 2003). Dari semua biosurfaktan dalam Tabel

3.1, beberapa jenis biosurfaktan yang telah banyak digunakan saat ini, diantaranya adalah Surfactin, Surfactant BL86, Iturin, Lichenysin A, Lichenysin B, C, Flavolipid, Mannosylerythritol, Rhamnolipid RL1 dan RL2, Emulsi dan Biodispersan.

Beberapa jenis mikroba yang dapat digunakan untuk menghasilkan surfaktan proses teknologi MEOR, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3.2 (Banat, 1995; banat et al., 2000; Cameotra et al., 1998; Makkar et al., 1998 and Makkar et al., 2002).

Tabel 3.1. Biosurfaktan dan Mikroba Penghasilnya
(Palashpriya et al., 2008)

Biosurfaktan	Mikroba Penghasilnya	
	Mikroba	Jamur
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> F2.2 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 <i>Bacillus subtilis</i> LB5a <i>Bacillus subtilis</i> MTCC 1427 and MTCC 2423	-
Surfactant BL86	<i>Bacillus licheniformis</i> 86 -	-
Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp. MIS38	-
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
Plipastatin	<i>Bacillus licheniformis</i> F2.2	-
Massetolides	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SS101	-
Iturin	<i>B. amyloliquefaciens</i> B94 <i>Bacillus subtilis</i> RB14	-
Lichenysin A	<i>Bacillus licheniformis</i> BAS50	-
Lichenysin B, C	<i>Bacillus</i> sp	-
Bamylomycin	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-
Halobacillin	Marine <i>Bacillus</i> sp.	-
Isohalobacillin	<i>Bacillus</i> sp. A1238	-
Bioemulsifier	<i>Bacillus stearothermophilus</i> VR-8	<i>Candida lipolytica</i>
Flavolipid	<i>Flavobacterium</i> sp. MTN11 -	-
Mannosylerythritol	-	<i>Candida antarctica</i> lipid (MEL) <i>Pseudozyma antarctica</i> JCM 10317T
Rhamnolipids RI dan R2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -	-

Biosurfaktan	Mikroba Penghasilnya	
	Mikroba	Jamur
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i> EM1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> GS3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1 <i>P. putida</i> 300-B mutant (obtained from <i>Pseudomonas putida</i> 33 wild strain by gamma ray mutagenesis)	-
Rhamnolipid RL1 dan RL2	<i>Pseudomonas</i> sp. 47T2 NCIB 400044 -	-
Rhamnolipids (RLLBI)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain LBI -	-
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 31012 -(RAG-1) <i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	-
Liposan	-	<i>C. lipolytica</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i> A2	-
Lactonic sophorose lipid	-	<i>T. bombicola</i> KSM-36
Fructose-lipids	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., - <i>Nocardia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.	-
Sophorolipids	-	<i>Candida bombicola</i>
Bioemulsan	<i>Gordonia</i> sp. BS29	-
Circulocin	<i>Bacillus circulans</i> , J2154	-
AP-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	-

Tabel 3.2. Jenis Mikroba dan Biosurfaktan Utama yang Dihasilkannya Melalui Proses MEOR

Class	Biosurfactant	Microorganisms
Low molecular weight	Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Trehalose lipids	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
		<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		<i>Mycobacterium</i> spp.
	Sophorose lipids	<i>Candida lipolytica</i>
		<i>Torulopsis bombicola</i>
	Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
	Polymixins	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Gramicidin S	<i>Bacillus brevis</i>
	Phospholipids	<i>Acinetobacter</i> spp.

Class	Biosurfactant	Microorganisms
		Thiobacillus thiooxidans
	Lipopeptides	Bacillus pumilis
		Bacillus licheniformis
		Pseudomonas fluorescens
	Polyol lipids	Rhodotorula glutinis
		Rhodotorula graminis
	Serrawettin	Serratia marcescens
	Fatty acids (corynomycolic acids, spiculisporic acids)	Corynebacterium lepus Arthrobacter parafineus Penicillium spiculisporem Talaromyces trachyspermus
	Sulfonylipids	Capnocytophaga spp.
	Diglycosyl diglycerides	Lactobacillus fermentii
High molecular weight	Alasan	Acinetobacter radioresistens
	Emulsan	Acinetobacter calcoaceticus
	Biodispersan	Acinetobacter calcoaceticus
	Liposan	Candida lipolytica
	Mannan-lipoprotein	Candida tropicalis
	Food emulsifier	Candida utilis
	Insecticide emulsifier	Pseudomonas tralucida
	Sulfated polysaccharide	Halomonas eurihalina
	Acetyl heteropolysaccharide	Sphingomonas paucimobilis

ISOLASI MIKROBA ASBUTON PENGHASIL SURFAKTAN

4.1. Pengambilan Sampel Asbuton Sumber Isolat Mikroba Hidrokarbonoklastik

Sampel asbuton yang digunakan adalah asbuton yang diambil langsung di lapangan, yaitu di tempat-tempat yang masih alami dimana di atas asbuton tersebut masih terdapat tumbuhan atau lumut ataupun kotoran lainnya dan air (Gambar 4.1) Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada beberapa titik di masing masing daerah yang diyakini asbutonnya memiliki perbedaan sifat. Dalam satu daerah sampel asbuton diambil dari beberapa tempat atau titik yang berbeda. Tipikal penampakan sampel yang diambil seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.1. Tipikal Lokasi Pengambilan Sampel Asbuton di Pulau Buton



Gambar 4.2. Sampel yang Diambil Secara Alami dari Pulau Buton

4.2. Identifikasi Sifat dari Sample Asbuton

Contoh asbuton yang diambil secara langsung di lapangan tersebut selanjutnya dipecahkan dan diuji sifat-sifatnya. Hasil pengujian ini seperti yang diberikan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Sifat-sifat Asbuton yang Digunakan

Sumber Asbuton	Kode	Sifat-sifat				
		Raw Asbuton		Bitumen Asbuton Hasil Ekstraksi		
		Kadar Aspal (%)	Kadar Air (%)	Penetrasi (dmm)*	Titik Lembek (°C)	Daktilitas (cm)**
Kabungka-BAI	K-1	21,7	17	1	93,2	0
Kabungka-BAI	K-2	11,8	3	1	95,2	0
Kabungka-BAI	K-3	18,4	9,6	4	81,4	0
Lawe-le-Saka	LS-1	27,5	1,1	117	45,8	120
Lawe-le-Saka	LS-2	31,0	1,1	65	53,3	>140
Lawe-le-Saka	LS-3	29,3	10,6	108	45,8	>140
Lawe-le-Kirana Bakti	LK-1	28,8	13,5	128	43,5	>140
Lawe-le-Kirana Bakti	LK-2	28,6	14,6	112	44,4	>140
Lawe-le-Kirana Bakti	LK-3	27,8	6,2	115	44,9	>140

Catatan : * Pengujian penetrasi dilakukan pada 25 °C, 100 g, 5 detik

** Pengujian daktilitas (25 °C, 5 cm/mnt)

4.3. Isolasi Mikroba Hidrokarbonoklastik

Di laboratorium, sampel yang diambil dari satu titik pengambilan di pulau Buton dihaluskan dan diaduk secara merata agar mikroba yang terdapat disampel tersebut semuanya terwakili dalam satu spesimen.

Mikroba yang terdapat pada specimen ini diaktivasi dalam medium cair SMSS (*Stone Mineral Salt Solution*). Medium ini dibuat dengan menggunakan air suling (destilat) secukupnya (\pm 100 ml) yang dicampur berturut-turut dengan NH_4NO_3 : 2,5 gram; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1 gram; KH_2PO_4 : 0,5 gram; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 gram; $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 gram; ekstrak ragi : 0,1 gram dan CaCO_3 sebanyak 5 gram. Semua bahan-bahan tersebut dimasukkan dan dicampur menjadi satu dalam satu labu Erlenmeyer.

Penggunaan ekstrak ragi untuk pembuatan medium cair SMSS tersebut di atas adalah sebagai sumber N dalam bentuk asam amino dan *growth factor* tambahan untuk mikroba yang akan diisolasi. Untuk mempermudah penyebutannya, medium cair SMSS yang sudah mengandung ekstrak ragi ini selanjutnya disebut medium cair SMSSe.

Setelah semua bahan masuk, kemudian tambahkan lagi air suling ke dalam labu Erlenmeyer sehingga didapatkan media cair (medium SMSS) dengan volume total sebanyak satu liter dengan nilai PH 6-7. Kemudian setelah itu, 1% (dari berat media cair, b/v)) asbuton yang mengandung mikroba (konsorsium mikroba) ditambahkan ke dalam labu tersebut sebagai sumber karbon dan diikuti dengan penambahan 20 gram *sludge*. Akibat penambahan kedua bahan ini, medium cair yang dihasilkan seyogyanya tetap memiliki nilai PH 6-7. Untuk menjamin kesterilan, penambahan spesimen asbuton ke dalam labu Erlenmeyer harus dilakukan secara aseptis, yaitu dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (kotak beraliran udara steril, Gambar 4.3.a). Setelah itu, dengan menggunakan *autoclave* (Gambar 4.3.b) media cair ini disterilisasi pada temperatur 121 °C dan tekanan sebesar 1,5 psi selama 15-

20 menit. Pada Gambar 4.4 ditunjukkan medium cair SMSSe yang sudah siap untuk digunakan.



a. Laminar Air Flow Cabinet



b. Autoclave

Gambar 4.3. Peralatan untuk Proses Isolasi Mikroba



Gambar 4.4. Medium Cair SMSSe

Setelah medium cair SMSSe tersebut di atas siap, isolasi dilakukan dengan memasukkan spesimen asbuton yang masih mengandung konsorsium mikroba. Isolasi dilakukan dalam 3 tahap. Isolasi Tahap I didahului dengan mencuplik 10% (terhadap volume media, b/v) dari sampel yang ditumbuhkan secara aerob fakultatif pada medium cair SMSSe selama 6 hari. Agar tidak tercemar dengan mikroba lainnya yang mungkin terdapat di luar specimen asbuton, penambahan spesimen asbuton ini ke dalam

labu Erlenmeyer juga harus dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*.

Labu Erlenmeyer yang sudah berisi mikroba tersebut dikocok dengan menggunakan *rotary shaker incubator* (Gambar 4.5.a.) dengan kecepatan 120 rpm selama 3 hari dan kemudian dilanjutkan dengan fase stasioner selama 3 hari (Gambar 4.5.b). Pada tahap ini terdapat konsorsium mikroba dalam jumlah banyak untuk selanjutnya dilakukan isolasi Tahap II.



a. *Rotary Shaker Incubator*



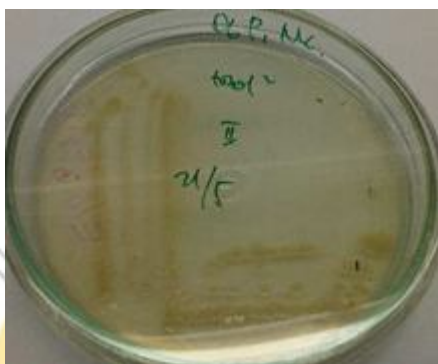
b. Fase Stasioner

Gambar 4.5. Pengocokan dan Kondisi *Stationary* Mikroba Pada Proses Isolasi Tahap I

Sebelum dilakukan isolasi Tahap II (pemisahan konsorsium mikroba menjadi koloni tunggal), medium SMSSe padat sebagai media pembiakan koloni tunggal harus disiapkan terlebih dahulu. Medium SMSSe padat ini dibuat dengan menggunakan bahan-bahan untuk pembuatan medium SMSS cair seperti yang telah disebutkan di atas tetapi dengan penambahan agar-agar sebanyak 5 ml – 10 ml. Cara dan langkah-langkah pembuatan medium padat ini dilakukan dengan cara yang sama seperti halnya pembuatan medium SMSSe cair, kecuali adanya penambahan agar-agar tersebut. Setelah adonan medium SMSSe padat siap, tuangkan medium ini sebanyak 5 ml – 10 ml ke dalam cawan petry, lalu diamkan sampai seluruh medium tersebut membeku menjadi medium SMSSe padat.

Baru setelah itu, isolasi Tahap II dapat dilakukan. Isolasi Tahap II dilakukan dengan mencuplik 0.1 ml dari medium SMSSe hasil

isolasi Tahap I. Contoh diambil dengan mikro pipet untuk selanjutnya dibiakkan di atas lempeng agar SMSSe padat dengan metode *spread way* (Gambar 4.6). Pada metoda ini; pemindahan (penetrasi) dan perataan 0,1 ml media SMSSe cair yang mengandung mikroba ke atas media padat yang terdapat dalam cawan petry dilakukan dengan menggunakan batang berbentuk L. Untuk menjamin kesterilan, proses pemindahan ini dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Selanjutnya medium SMSSe padat yang telah diinokulasi/ditanami mikroba kemudian diinkubasi (pembiasaan) dengan cara menyimpan cawan petry tersebut pada temperatur ruang (umumnya mikroba aerob berkembang pada *ambient* temperatur) dalam lemari steril selama 7 hari.

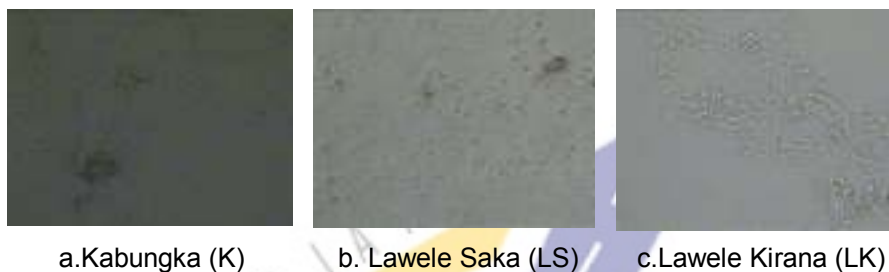


Gambar 4.6. Hasil Pemindahan Mikroba dengan Metoda *Spread Way* Pada Proses Isolasi Tahap II

Mikroba yang tumbuh pada Tahap I dicuplik sebanyak satu Oose (alat yang berbentuk cincin kecil bertangkai) dan ditanam kembali pada medium SMSSe padat lainnya (medium SMSS padat baru yang dibuat dengan komposisi dan cara yang sama dengan medium padat sebelumnya) dalam suatu cawan petry yang steril yang sudah dipersiapkan sebelumnya. Proses ini dilakukan dengan metode *four way streak*, yaitu dengan cara mencuplik sample sebanyak 1 Oose dari koloni pada cawan kemudian digores sebanyak 4 kali pada media agar SMSSe padat. Segera setelah proses selesai, selanjutnya dilakukan proses diinkubasi. Proses

inkubasi ini dilakukan pada *ambient* temperatur dalam ruang steril selama waktu tertentu (tergantung pertumbuhan mikroba, umumnya selama 7 hari atau sampai didapatkan koloni tunggal).

Pada isolasi Tahap II ini, dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, terlihat konsorsium mikroba tumbuh pada cawan petry (Gambar 4.7). Konsorsium mikroba tumbuh ini berbeda-beda setiap cawannya. Pada setiap cawan, mikroba yang tumbuh pada ujung terakhir dari *four way streak* selanjutnya dicuplik untuk proses isolasi tahap III yaitu pemurnian mikroba sehingga mendapatkan mikroba tunggal.



Gambar 4.7. Hasil Pengamatan Mikroskop Hasil Isolasi Tahap II

Isolasi Tahap III dilakukan dengan mencuplik koloni tunggal hasil isolasi Tahap II. Setiap koloni tunggal pada Tahap II yang tumbuhnya berbeda dimurnikan kembali pada medium SMSSe padat miring. Medium SMSSe padat miring dibuat dengan cara mengisi media ke tabung reaksi yang dilakukan secara miring (bersudut 25°C) sehingga didapatkan medium SMSSe padat yang miring (Gambar 4.8). Kemudian di atas medium SMSSe padat miring ini (umumnya disebut medium miring), sebanyak satu Oose (alat yang berbentuk cincin kecil bertangkai) mikroba yang didapat ditanamkan kembali dengan cara penyebaran secara zig zag. Setelah penyebaran selesai, tahap selanjutnya adalah melakukan proses inkubasi mikroba (Gambar 4.9). Dari 60 benda uji digunakan, Pada Tabel 4.2 ditunjukkan bahwa hanya 30 isolat berhasil diisolasi, yaitu yaitu 3 dari Kabungka (K), 13 dari Lawele Saka (LS) dan 14 dari Lawele Kirana Bakti (LK). Banyaknya jenis

mikroba dari masing-masing sumber asbuton yang hidup pada media ditunjukkan pada Tabel 4.3.

4.4. Kultifasi

Semua isolat tunggal yang tumbuh pada media SMSSe hasil Tahap III dipelihara dalam tabung reaksi berisi media agar SMSSe miring dan dijadikan stok untuk tahap penelitian selanjutnya.



Gambar 4.8. Medium SMSS Padat Miring untuk Pembiakan Mikroba, Proses Isolasi Tahap III



Gambar 4.9. Proses Inkubasi Mikroba Asbuton Mikroba

Tabel 4.2. Sumber Asbuton yang Digunakan yang Menghasilkan Mikroba

Sumber Asbuton	Kode	Jumlah Jenis Mikroba yang hidup
Kabungka	K	3
Lawele-Saka	LS	13
Lawele-Kirana Bakti	LK	14
TOTAL		30

Tabel 4.3 . Mikroba Asbuton Hasil Isolasi dari 60 Isolat

No	Kode Isolat	No	Kode Isolat
1	Lawele Saka isolate 1 (LS1)	16	Lawele Kirana isolate 2b (LK2b)
2	Lawele Saka isolate 2a (LS2a)	17	Lawele Kirana isolate 3a (LK3a)
3	Lawele Saka isolate 2b (LS2b)	18	Lawele Kirana isolate 3b (LK3b)
4	Lawele Saka isolate 2c (LS2c)	19	Lawele Kirana isolate 3c (LK3c)
5	Lawele Saka isolate 2d (LS2d)	20	Lawele Kirana isolate 3d (LK3d)
6	Lawele Saka isolate 3 (LS3)	21	Lawele Kirana isolate 4 (LK4)
7	Lawele Saka isolate 4 (LS4)	22	Lawele Kirana isolate 5 (LK5)
8	Lawele Saka isolate 5 (LS5)	23	Lawele Kirana isolate 6 (LK6)
9	Lawele Saka isolate 6 (LS6)	24	Lawele Kirana isolate 7 (LK7)
10	Lawele Saka isolate 7 (LS7)	25	Lawele Kirana isolate 8 (LK8)
11	Lawele Saka isolate 8 (LS8)	26	Lawele Kirana isolate 9 (LK9)
12	Lawele Saka isolate 9 (LS9)	27	Lawele Kirana isolate 10 (LK10)
13	Lawele Saka isolate 10 (LS10)	28	Kabungka isolate 1 (K1)
14	Lawele Kirana isolate 1 (LK1)	29	Kabungka isolate 2 (K2)
15	Lawele Kirana isolate 2a (LK2a)	30	Kabungka isolate 3 (K3)

4.5. Screening Mikroba

Setelah didapatkan mikroba-mikroba tunggal, proses selanjutnya adalah melakukan pengujian untuk mengetahui tingkat

pertumbuhan dari mikroba-mikroba dan memilih (*screening*) secara visual mikroba mana yang dapat menghasilkan biosurfaktan.

Seleksi awal dilakukan secara visual terhadap koloni yang mampu hidup (tumbuh) dalam masing-masing medium SMSSe hasil isolasi Tahap III. Isolat yang paling banyak tumbuh dalam masing-masing medium dipilih untuk diuji tingkat pertumbuhannya dan potensi biosurfaktan yang dapat dihasilkannya.

4.5.1. Analisis Pertumbuhan

Analisis pertumbuhan mikroba dilakukan dengan metode Hidrolisis FDA (*Fluorescein Diacetate*). Metode hidrolisis FDA adalah metode pengukuran jumlah total sel mikroba hidup secara tidak langsung dengan melihat aktivitas enzim ekstraseluler yang ditunjukkan oleh intensitas warna yang muncul akibat terjadinya hidrolisis FDA oleh berbagai macam enzim ekstraseluler. Produk dari hidrolisis enzim ini adalah zat fluorescein yang dapat dideteksi secara kuantitatif dengan menggunakan fluorometer atau spektrofotometer (Schnurer et al., 1982).

Semakin banyak jumlah mikroba yang hidup maka akan semakin banyak FDA yang terhidrolisis yang teramati secara kuantitatif dari nilai absorbansi (*optical density*) sebagai hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu. Semakin tinggi nilai absorbansi yang terukur, semakin tinggi konsentrasi senyawa yang dihasilkan (konsentrasi fluorescein) yang secara tidak langsung menunjukkan tingkat aktivitas enzimatik mikroba.

Pada prinsipnya, ada dua tahapan pekerjaan yang dilakukan pada uji pertumbuhan dengan metode FDA, yaitu pembuatan kurva standar FDA (larutan blanko) dan Pengukuran FDA terhidrolisis. Untuk pembuatan kurva standar FDA, sebanyak 40 μL , 60 μL , 80 μL , 120 μL , dan 160 μL FDA masing-masing dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, kemudian dikocok dengan kecepatan 90

rpm selama 20 menit. Setelah 20 menit, masing-masing ditambahkan 4 ml aseton dan disaring dengan kertas Whatman #1, lalu diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 490 nm. Hasil dari pengukuran tersebut kemudian dibuat grafik dan dihitung persamaannya sebagai kurva standar.

Sedangkan untuk pengukuran FDA terhidrolisis, sebanyak 1 ml inokulum masing-masing dicuplik setiap hari selama 7 hari dan secara aseptis (steril) dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berkapasitas 25 ml. Kemudian pada masing-masing labu Erlenmeyer tersebut ditambahkan 4 ml bufer KH_2PO_4 60 mM PH 7.6 dan 40 μL larutan FDA yang sebelumnya disimpan dalam lemari pendingin (catatan mM = mili Molar). Segera setelah penambahan FDA, sampel dikocok pada temperatur 25°C dengan kecepatan 90 rpm selama 20 menit.

Setelah itu, ditambahkan 4 ml aseton proanalisis kedalamnya dan selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas Whatman #1. Filtrat yang didapat dari proses penyaringan ini kemudian diukur absorbansinya (nilai OD) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Untuk larutan blanko, dilakukan hal serupa tetapi didalamnya tidak dimasukkan inokulum. Hasil yang didapat (nilai OD) kemudian ditransmormasikan pada persamaan garis kurva standar FDA. Hasil pengujian OD dari isolat-isolat ini diberikan pada Tabel 4.4. Dari tabel ini diketahui bahwa tingkat OD ke 30 isolat dalam medium yang sama adalah berbeda satu dengan yang lainnya. Isolat dengan kode LS8 merupakan isolat dengan nilai OD yang tertinggi.

4.5.2. Analisis Biosurfaktan

Analisis biosurfaktan dilakukan melalui uji Hemolisis. Isolat mikroba yang berhasil diperoleh ditanamkan pada lempeng agar darah (*blood jelly*). Hal ini bertujuan untuk menseleksi isolat-isolat

mana saja yang dapat menghasilkan biosurfaktan (Banat, 1995; Tabatabae, 2005). Teori yang digunakan pada pengujian ini adalah bahwa surfaktan berfungsi sebagai zat haemolisin sedangkan hemolisin itu sendiri memiliki fungsi sebagai antibodi terhadap antigen membran eritrosit yang membuatnya mengalami hemolisis (Yatim, 2003). Oleh sebab itu, pada uji hemolisis ini mikroba yang dapat menghasilkan biosurfaktan adalah mikroba yang dapat menghasilkan zona bening disekeliling koloninya (Gambar 4.10).

Dari 30 isolat yang diuji potensinya untuk menghasilkan biosurfaktan hanya 7 dari isolat tersebut yang dapat menghasilkan biosurfaktan, yaitu sebagaimana yang diberikan pada Tabel 4.5, yaitu: LS5, LS10, LS3, LK5, LK3A, LK1 dan LK2B. Potensi terbesar dari satu mikroba dalam memproduksi biosurfaktan dapat dilihat dari berat biosurfaktan yang dihasilkannya. Dari ke tujuh mikroba yang menghasilkan biosurfaktan ini, dalam Tabel 4.5 dapat dilihat bahwa isolat yang memiliki potensi terbesar penghasil biosurfaktan adalah isolat dengan kode LS5. Potensi isolat ini dalam memproduksi biosurfaktan adalah 1,5 sampai 5 kali potensi isolat lainnya.

Tabel 4.4. Hasil Analisis Pertumbuhan

NO	Kode Isolat	OD	NO	Kode Isolat	OD
1	LS8	2.031	16	LK4	0.763
2	LK3A	1.706	17	K2	0.712
3	LS3	1.575	18	LK7	0.699
4	LS9	1.466	19	LK2B	0.618
5	LK1	1.355	20	K3	0.563
6	LK6	1.305	21	LS2B	0.543
7	LK3B	1.232	22	LS2A	0.508
8	LS4	1.042	23	LK5	0.500
9	LK2A	0.895	24	LS10	0.452
10	LS2D	0.857	25	K1	0.445
11	LS2C	0.853	26	LK9	0.369

NO	Kode Isolat	OD
12	LK8	0.809
13	LS7	0.804
14	LK10	0.789
15	LS6	0.783

NO	Kode Isolat	OD
27	LS5	0.358
28	LK3D	0.310
29	LS1	0.246
30	LK3C	0.308

Mikroba yang akan dipilih dalam proses *screening* ini seyogyanya adalah mikroba penghasil biosurfaktan terbanyak dengan nilai OD yang tertinggi. Tetapi seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.6, mikroba penghasil biosurfaktan terbanyak belum tentu memiliki OD tertinggi dan sebaliknya. Berdasarkan hal tersebut, diperlukan kombinasi mikroba agar didapatkan suatu isolat yang dapat menghasilkan biosurfaktan terbanyak dan OD tertinggi.



a. Media Blood Agar



b. Inokulasi Isolat pada Blood Agar



c. Negatif Biosurfaktan



d. Positif Biosurfaktan

Gambar 4.10. Hasil Uji Hemolisis Mikroba

Tabel 4.5 Hasil Analisis Biosurfaktan

No	Kode Isolat	Berat Biosurfaktan (gram)
1	LS5	0.0062
2	LS10	0.0040
3	LS3	0.0039
4	LK5	0.0033
5	LK3A	0.0026
6	LK1	0.0020
7	LK2B	0.0013

Tabel 4.6. OD Mikroba Penghasil Biosurfaktan

No	Kode Isolat	Berat Biosurfaktan (gram)	OD
1	LS5	0.0062	0.358
2	LS10	0.0040	0.452
3	LS3	0.0039	1.575
4	LK5	0.0033	0.500
5	LK3A	0.0026	1.706
6	LK1	0.0020	1.355
7	LK2B	0.0013	0.618

Dengan kombinasi matrik 7 x 7 didapatkan 49 variasi kombinasi mikroba yang akan diuji potensi produksi biosurfaktan dan nilai OD yang dihasilkannya. Dari 49 variasi ini, lima isolat kombinasi yang memberikan hasil yang terbaik adalah LS5-LK3A, LS5-LS3, LS10-LS3, LS10-LK3A dan LS3-LK3A. Banyaknya biosurfaktan dan nilai OD masing-masing isolat kombinasi mikroba ini adalah seperti yang diberikan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7. Biosurfaktan dan OD Isolat Kombinasi Mikroba

No	Kode Isolat	Berat Biosurfaktan (gram)	OD
1	LS5-LK3A	0.0098	1.330
2	LS5-LS3	0.0027	0.210
3	LS10-LS3	0.0023	0.198
4	LS10-LK3A	0.0019	0.661
5	LS3-LK3A	0.0013	0.130

4.6. Optimasi

Proses optimasi bertujuan untuk menentukan medium dan kondisi terbaik yang menghasilkan biosurfaktan. Hal diperlukan karena perubahan substrat seringkali dapat mengakibatkan perubahan struktur dan kemampuan biosurfaktan yang dihasilkan (Fiechter, 1992). Selain itu, Biodegradasi oleh biosurfaktan dipengaruhi oleh struktur senyawa yang akan didegradasi, jenis mikroba yang digunakan sebagai penghasil biosurfaktan dan faktor lingkungan, seperti pH, temperatur, cahaya, sumber nutrisi dan oksigen.

Berdasarkan hal hal tersebut di atas, setelah didapatkan beberapa mikroba terpilih, proses isolasi diulangi kembali tetapi dengan menggunakan medium yang terpilih dari proses *screening* tersebut di atas dan dengan bervariasi jumlah inokulum, PH dan temperatur pada proses inkubasi. Optimasi yang dilakukan hanya pada isolat kombinasi terbaik, yaitu LS5-LK3A. Optimasi ini dilakukan pada variasi:

- Medium (molase): 5% dan 10%
- Asbuton : 5% dan 10%
- pH : pH 3 dan pH 8
- Temperatur : 10°C dan 60°C.

Hasil dari proses optimasi ini yaitu seperti yang diberikan pada Tabel 4.8. Dari hasil optimasi ini dapat disimpulkan bahwa isolat kombinasi LS5-LK3A dapat tumbuh dengan baik dan menghasilkan biosurfaktan yang maksimal bila dibiakan pada kondisi optimum sebagai berikut:

- Kandungan asbuton dalam medium 1%
- Kandungan molase dalam medium 10%
- Kondisi pH 6-Netral
- Temperatur inkubasi 25 °C - 30 °C

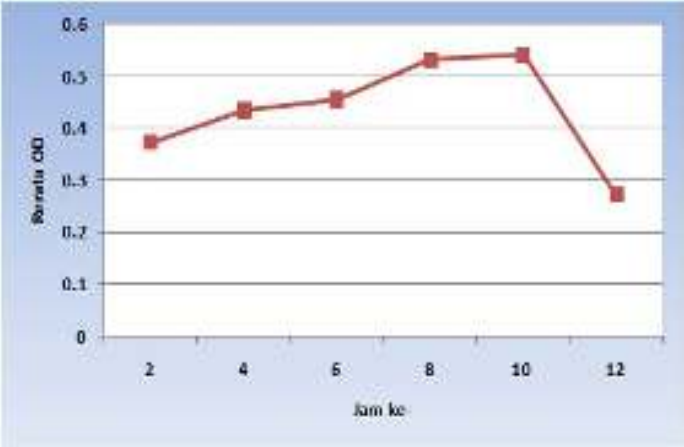
4.7. Karakterisasi Isolat Mikroba Indigen Asbuton Penghasil Biosurfaktan

Karakterisasi yang dilakukan meliputi karakter pertumbuhan dari kultur konsorsium dan pola produksi biosurfaktannya. Pada Gambar 4.11 ditunjukkan kurva pertumbuhan isolat Kode LS5-LK3A hasil optimasi. Kurva pertumbuhan diukur per 2 jam selama 12 jam dengan metode spektrofotometri dimana nilai OD merepresentasikan jumlah sel bakteri total dalam suspensi. Berdasarkan Gambar 4.11, diketahui bahwa pertumbuhan maksimum kultur pada isolat Kode LS5-LK3A dicapai pada jam ke-10. Dari jam ke-2 hingga 8, isolat mengalami pertumbuhan positif dengan laju maksimum antara jam ke 6-8, sementara dari jam ke 8-10 laju pertumbuhan mulai menurun sampai puncak pertumbuhan biomasa jam 10. Sedangkan mulai jam ke 10 kultur pada konsorsium isolat mengalami fase kematian dimana laju pertumbuhannya negatif.

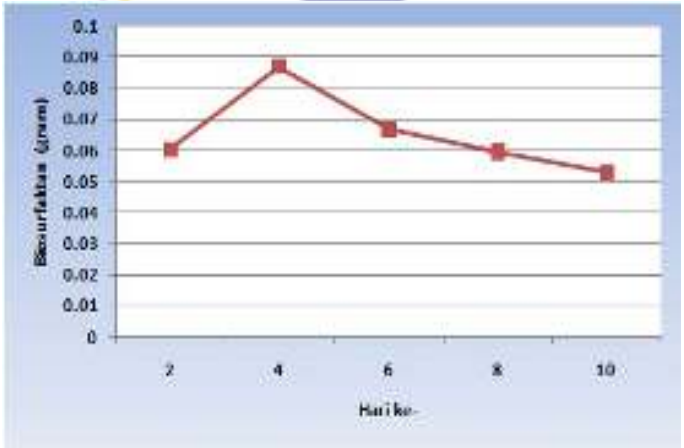
Tabel 4.8. Hasil Optimasi Isolat Kombinasi LS5-LK3A

Parameter Optimasi	Isolat Kombinasi LS5-LK3A	
	Berat Biosurfaktan (gram)	Rerata OD
Medium Asbuton		
- 5%	0.0066	1.8295
- 10%	0.0058	0.9295
Medium Molase		
- 5%	0.0137	1.1295
- 10%	0.0602	0.9295
Keasaman		
- pH 3	0.0083	0.6295
- pH 8	0.0091	0.3295
Temperatur		
- 10° C	0.0013	0.5795
- 60° C	0.0027	0.5395

Pola produksi biosurfaktan dari kultur konsorsium tersebut ditampilkan dalam Gambar 4.12. Dari gambar ini dapat dilihat bahwa pada hari ke-2 hingga ke-4 produksi biosurfaktan mengalami peningkatan dan setelah hari ke-4 produksi biosurfaktan mengalami penurunan. Puncak produksi biosurfaktan dari kultur tersebut dicapai pada hari ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa produksi optimum biosurfaktan untuk konsorsium isolat terbaik Kode LS5-LK3A adalah pada hari ke-4.



Gambar 4.11. Kurva Pertumbuhan Konsorsium Isolat Kode LS5-LK3A



Gambar 4.12. Kurva Produksi Biosurfaktan Konsorsium Isolat Kode LS5-LK3A

4.8. Identifikasi Mikroba Indigen Asbuton Perhasil Biosurfaktan

Identifikasi secara molekuler dengan menggunakan analisis DNA ribosom 16S dilakukan terhadap 2 isolat terpilih yakni isolat Kode LS5 dan Kode LK3A. Hasil pengolahan bioinformatik memberikan identitas terhadap isolat bakteri Kode LK3A dengan nama species *Photobacterium damselae*. Sedangkan hasil analisa bioinformatik terhadap isolat Kode LS5 memberi identitas dengan nama species Isolat Kode LS5 merupakan *Brevibacillus parabrevis*.



Bab 5

PENUTUP

Asbuton murni adalah salah satu dari produk asbuton yang didapat dengan cara mengekstraksi asbuton dengan menggunakan senyawa kimia. Pelarut berbasis minyak (*oil base solvent*) adalah jenis pelarut yang banyak digunakan untuk mengekstraksi asbuton. Penggunaan pelarut alami seperti terpentin juga sudah dilakukan. Namun demikian, kemampuan terpentin untuk melarutkan aspal tidak sekuat pelarut berbasis minyak. Dengan menambahkan surfaktan, daya larut terpentin dapat meningkat melebihi daya larut pelarut berbasis minyak.

Biosurfaktan adalah hasil ekskresi mikro organisme yang memiliki sifat mirip dengan surfaktan. Dibandingkan dengan surfaktan, biosurfaktan lebih ramah lingkungan selain tidak atau sedikit bersifat toksin, biosurfaktan lebih mudah terdegradasi di alam. Biosurfaktan memiliki fungsi yang luas, dapat digunakan baik sebagai pengencer-pengental, penurun tegangan permukaan, pembusaan, pembersih dan lain sebagainya.

Aspal apapun jenisnya mengandung senyawa alifatik dan aromatik jenuh dan tak jenuh dengan kandungan mencapai 150

atom C. Pada umumnya aspal mengandung unsur-unsur utama selain karbon seperti oksigen, nitrogen, sulfur, dan hidrogen. Senyawa organik aspal secara alamiah dapat terurai melalui proses mikrobiologis di alam dengan menggunakan mikroba hidrokarbonoklastik. Walaupun begitu, hanya mikroba hidrokarbonoklastik penghasil biosurfaktan yang dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon pada aspal.

Dari studi ini diketahui bahwa selain dapat digunakan sebagai modifier aspal atau bahkan bahan pengikat pengganti aspal minyak, asbuton dapat juga dimanfaatkan sebagai bahan penghasil biosurfaktan. Biosurfaktan dapat dihasilkan dari asbuton melalui proses biologis dengan menggunakan mikroba indigen yang secara alami hidup pada asbuton itu sendiri. Ada tujuh jenis mikroba indigen asbuton yang dapat menghasilkan biosurfaktan baik secara sendiri-sendiri ataupun bersama-sama (konsorsium). Penggunaan konsorsium mikroba akan memberikan hasil yang lebih baik bila dibandingkan dengan menggunakan satu jenis mikroba saja. Konsorsium mikroba yang memiliki tingkat produktifitas tertinggi, baik dari segi tingkat pertumbuhan maupun dari tingkat penghasil biosurfaktan adalah konsorsium mikroba dari jenis *Photobacterium* dan *Brevibacillus parabrevis*. Namun demikian, jenis dan kegunaan biosurfaktan yang dihasilkannya belum dapat diidentifikasi dengan baik.

Medium dan kondisi terbaik untuk menghasilkan biosurfaktan dengan menggunakan konsorsium kedua jenis mikroba tersebut di atas adalah pada medium dengan kandungan asbuton dan molase masing-masing sebesar 1% dan 10%. Medium harus memiliki tingkat keasaman dengan nilai pH 6-netral dan diinkubasi pada temperatur dalam rentang antara 25 °C - 30 °C.

DAFTAR PUSTAKA

- Banat, I. M., (1995), Biosurfactant Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation. *Biores. Technol.*
- Banat, I. M., R. S. Makkar, and S. S. Cameotra, (2000), Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:495-508
- Bodour, A.A., Guerrero-Barajas, C., Jiorle, B.V., Malcomson, M.E., Paull, A.K., Somogyi, A., Trinh, L.N., Bates, R.B. and Maier, R.M., (2004), Structure and Characterization of Flavolipids, a Novel class of Biosurfactants Produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. *Applied and Environmental Microbiology*.
- BPS, (2009.a), Sulawesi Tenggara Dalam Angka Tahun 2009, Badan Pusat Statistik, Propinsi Sulawesi Tenggara
- BPS, (2009.b), Kabupaten Buton Dalam Angka Tahun 2009, Badan Pusat Statistik, Kabupaten Buton
- Cameotra, S. S., and R. S. Makkar, (1998), Synthesis of Biosurfactants in Extreme Conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Christofi, N. & Ivshina, I.B., (2002), Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93 : 915-929.
- Clark, J. B., D. M. Munnecke, and G. E. Jenneman, (1981), In Situ Microbial Enhancement of Oil Production. *Dev. Ind. Microbiol.* . =
- Desai, J. D., and I. M. Banat, (1997), Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiol. Mol. Biol.*
- Fiechter, A., (1992), Biosurfactant: Moving Forward Industrial Application, *Tibtech*, Vol. 10.
- Franzett i, A., Bestett , G., Caredd a, P., La Colla P. and Tamb urini, E., (2008), Surface Active Compounds and Their Role in the Access to Hydrocarbons in *Gordonia* Strains. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Fujiwara, K., et al., (2004), Biotechnological Approach for Development of Microbial Enhanced Oil Recovery Technique. *Petroleum Biotechnology: Developments and Perspectives*, p. 405-445

- Gompul, D., (1992), Lapis Permukaan Jalan dengan Menggunakan Asbuton Mikro, Puslitbang Jalan dan Jembatan, Laporan Penelitian.
- Kosaric, N., Neil, C., C. Gray and W. L. Cair, (1987), Microbial Emulsifiers and De-Emulsifier, dalam HJ. Rehim and G. Reed. Biotechnology Vol. 3. Verlag Chenie.
- Kosaric, N., (1992), Biosurfactant in Industry. J Am Oil Chem Soc, Vol 64:1731-1737.
- Kurniadji, (2003), Pemanfaatan Asbuton Lawele untuk Perkerasan Jalan, Laporan Akhir Penelitian, Puslitbang Prasarana Transportasi, Bandung
- Lazar, I., I.G. Petrisor, and T.E. Yen, (2007), Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). Petroleum Science and Technology, p. 1353-1366
- Lee, S.C., Kim, S.H., Park, I.H., Chung, S.Y. and Choi, Y.L., (2007), Isolation and Structural Analysis of Bamylocin A, Novel Lipopeptide from *Bacillus Amyloliquefaciens* LP03 Having Antagonistic and Crude Oil-emulsifying Activity. *Archives of Microbiology*
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P., (2008), Brock Biology of Microorganisms, 12th edition, Pearson Benjamin-Cummings, San Francisco.
- Makkar, R. S., and S. S. Cameotra, (1998), Production of Biosurfactant at Mesophilic and Thermophilic Conditions by a Strain of *Bacillus subtilis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol
- Makkar, R. S., and S. S. Cameotra, (2002), An Update on The Use of Unconventional Substrates for Biosurfactant Production and Their New Applications. Appl. Microbiol. Biotechnol.
- Metting, F.B., (1993), Soil Microbial Ecology. Applications in Agriculture and Environment Management. Marcel Dekker. Inc. NY.
- Mukherjee, S., Das, P. and Sen, R., (2006) Towards Commercial Production of Microbial Surfactants. *Trends in Biotechnology*
- Neu, T. R., (1996), Significant of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of bacteria with Interfaces, Am. Soc. Microbial Vol. 60.
- Ollivier, B. and M. Magot, (2005), Petroleum Microbiology. 1st ed. ASM Press: Washington, DC. 365

- Palashpriya Das, Soumen Mujherjee and Ramkrishna Senm, (2008), Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews - Vol. 25, Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology, Kharagpur, West Bengal, India.*
- Panilaitis, B., Castro, G.R., Solaiman D. and Kaplan, D.L., (2006), Biosynthesis of Emulsan Biopolymers from Agro-based Feedstocks. *Journal of Applied Microbiolog.*
- Reed, J. P., ---, Volumetric Analysis and Three Dimensional Virtualization of Industrial Mineral Deposits, Rockware Incorporated, 2221 east Street, Golden, Colorado.
- Rockware, ---, Rockworks Software, Rockware Incorporated, 2221 east Street, Golden, Colorado.
- Sen, R., (2008), *Biotechnology in Petroleum Recovery: The Microbial EOR. Progress in Energy and Combustion Science.*
- Sen, R., (1997) Response Surface Optimization of the Critical Media Components for Production of Surfactin. *Journal of Chemical Technology Biotechnology.*
- Sen, R. and Swaminathan, T., (2004) Response Surface Modeling and Optimization to Elucidate the Effects of Inoculum Age & Size on Surfactin Production. *Biochemical Engineering Journal.*
- Schlegel, H.G., (1986), *General microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Schnurer J, Rosswall T., (1982), Fluorescein Diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* 43:1256-1261.
- Sikumbang, N., Sanyoto, P., Supandjono, R. J. B. dan Gafoer, S., (1995), *Peta Geologi Lembar Buton skala 1:100.000. Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi. Bandung.*
- Shabtai, Y., (1990), Production of Exopolysaccharides by *Acinetobacter* Strains in a Controlled Fed-batch Fermentation Process Using Soap Stock Oil (SSO) as Carbon Source. *International Journal of Biological Macromolecules.*
- Sri Sumarsih, (2003), *Mikro Biologi Dasar, Diklat Kuliah, Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, UPN Veteran, Yogyakarta*

- Stosur, G. J., (1991), Unconventional EOR concepts. Crit. Rep. Appl. Chem.
- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg, J.L.Ingraham., (1980), The Microbial Word, Prentice Hall, Inc.,New Jersey.
- Tabatabai, M.A., (1994), Soil Enzymes. *In Methods of soil analysis, Part 2. Micrological and Biochemical Properties* (Weaver, R.W., Angle, J.S. & Bottomley, P.S., Eds), Soil Science Society of America, Madison, WI.pp 775-833.
- Thavasi R, Nambaru M.S., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I.M., (2009), Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. *Mar Biotechnol* 11:551-556.
- Van Dyke, M., Wiestreich, G. A and Lechtman, M. D., (1991), Application of Microbial Surfactants, *Biotech Adv.* Vol 9.
- Van Hamme, J.D., A. Singh, and O.P. Ward, (2006), Petroleum Microbiology - Part 1: Underlying biochemistry and physiology. *Chimica Oggi-Chemistry Today*.
- Vance-Harrop, M.H., de Gusmão, N.B. and de Camp os-Takaki, G.M., (2003) New Bioemulsifiers Produced by *Candida Lipolytica* Using D-Glucose and Babassu Oils Carbon Sources. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Yatim, W., (2003), Kamus Biologi. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia.
- Zajic, J. E., Gerson D. F, (----), Microbial Extraction of Bitumen From Athabasca Oil Sand, Biochemical Engineering, The University of western Ontario, London-Canada
- Zajic, J. E., Guinard, H and F. D. Gerson, (1977), Emulsifying and Surface Active Agents from *Corynebacterium Hydrocarbonclatus*, *Biotech and Bioengineering*, Vol 19.