

MENINGKATKAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN BAKTERI *Bacillus macerans* STRAIN TS9-8 DENGAN PERLAKUAN FAKTOR LINGKUNGAN (pH, SUHU DAN SUPLAI OKSIGEN).

Oleh : M.Hasbi¹, Gunawan Tabrani²

Abstrak

Biosurfaktan merupakan salah satu produk bioremediasi untuk penangani pencemaran minyak bumi di perairan ataupun lahan yang ramah lingkungan. Peningkatan produksi akan memperbesar efisiensi pemulihan pencemaran sehingga pemulihan lingkungan dapat berjalan lebih cepat. Untuk peningkatan produksi biosurfaktan oleh bakteri *Bacillus macerans* Strain TS9-8 telah dilakukan kajian dengan percobaan faktorial terhadap proses fermentasi selama 24 jam. Percobaan yang dilakukan terdiri dari tiga factor dan masing-masing tiga taraf untuk pH dan suhu, sedangkan suplay oksigen satu taraf saja: (pH: 5,3 ; 6,8 ; 8,3 , Suhu 30°C ; 33,5°C; 37°C dan suplay oksigen 200 rpm). Berdasarkan hasil analisis uji DNMR 5% menunjukkan bahwa interaksi antara suhu dan pH berpengaruh sangat nyata terhadap produksi biosurfaktan dimana taraf pH 8,3 dengan suhu 30°C memberikan hasil yang paling tinggi. Sebaliknya interaksi yang sama memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan pertumbuhan bakteri *Bacillus macerans* Strain TS9-8.

Kata kunci: biosurfaktan, *Bacillus macerans*, meningkatkan, produksi, biosurfaktani

1. PENDAHULUAN

Riau sebagai penghasil lebih 50 % minyak bumi skala nasional yang menjadikannya pemasuk devisa ketiga terbesar negara (Surjadi, 2000), justru menghadapi masalah pencemaran minyak yang serius yang bersumber dari berbagai aktivitas baik dari eksplorasi, penggunaan, transportasi maupun akibat tumpahan dari peristiwa kecelakaan tanker di perairan Selat Malaka (Feliatra, 2002). Keberadaan senyawa hidrokarbon ini di lingkungan merupakan tanggung jawab badan ekologi dan kesehatan masyarakat, karena sifat persisten, toksik dan bioakumasinya (Canny, G. and Broaders, M. 1999).

Berbagai teknologi telah digunakan untuk membersihkan pencemar tersebut, termasuk bermacam metoda kimia dan fisika seperti ekskafasi, evaporasi termal, pencucian tanah, pompa dan perlakuan air bawah tanah dan ekstraksi uap tanah. Bagaimanapun, yang terbaru, satu teknologi yang perhatian meningkat penerimaannya adalah bioremediasi. Metode ini merupakan suatu proses alamiah menggunakan modifikasi mikroba yang

merombak pencemar menjadi senyawa yang tidak beracun yang akhirnya menghasilkan CO₂ dan air (Canny, G. and Broaders, M. 1999).

Satu metode yang telah diteliti untuk menjawab masalah diatas adalah menggunakan surfaktan yang diproduksi secara alami oleh mikroorganisme, yang dikenal **biosurfaktan**. Biosurfaktan yang diproduksi secara alami, lebih ramah lingkungan dan dapat diurai secara biologi, tidak seperti kebanyakan surfaktan sintetik. Beberapa keunggulannya adalah dapat diuraikan secara biologi (biodegradable), toksisitas yang rendah, bahan baku tersedia di alam dalam

- 1) Staf Pengajar Jurusan MSP Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNRI, Keahlian Bioteknologi Pengolahan Limbah
- 2) Staf Pengajar Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian UNRI,

Keahlian Ekofisiologi Tumbuhan jumlah besar dan murah, dapat diproduksi dari buangan industri, digunakan sebagai pengendalian lingkungan terutama pengendalian tumpahan minyak dan sebagainya (Kosaric, N. 1992 dan Lin, S. C. et al. 1994). Walaupun demikian satu masalah yang dihadapi adalah usaha untuk memproduksi skala besar karena produknya yang

sedikit. Hal ini akan menyebabkan biaya produksi menjadi mahal (Kosaric, N. 1991; Georgion, G et al. 1992; Fiechter, A. 1992 dan Banat, I.M. 1995).

Biosurfaktan mempunyai banyak jenis yang dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme yang mencakup yeast, bakteri dan fungi (Fiechter, A. 1992). Banat, I. M. (1995) melaporkan tak kurang dari 29 jenis mikroorganisme yang dapat memproduksi biosurfaktan. Mikroorganisme tertentu yang ditemukan di alam tumbuh dan beradaptasi dengan baik pada lingkungannya yang sesuai, seperti mikroorganisme yang diperoleh dari reservoir minyak, tanah atau laut. Salah satu mikroorganisme yang baru ditemukan adalah *Bacillus macerans* strain TS9-8 (Murni, M. M. M. 1998). Dilaporkannya bahwa mikroorganisme ini dapat menghasilkan biosurfaktan yang mempunyai ciri-ciri kimianya menyerupai surfektin standar yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*. Akan tetapi kajian lebih lanjut tentang kemampuannya memproduksi biosurfaktan belum dilakukan lebih mendalam.

Pada proposal ini ingin dikaji aspek lingkungan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi biosurfaktan. Hasbi, M. dan Purwanto, E. (2003) melakukan kajian menggunakan bakteri ini dalam menentukan konsentrasi substrat terbaik untuk memproduksi biosurfaktan. Hasil yang diperoleh adalah konsentrasi substrat gliserol terbaik sebesar 2% dengan optikal densitas (absorban) 2,415 dan menurunkan tegangan permukaan dari 57 dyne/Cm menjadi 30,60 dyne/Cm. Hasil kajian tersebut tergolong rendah bila dibandingkan dengan hasil kajian Carrera, P. et. al. (1992) menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* yang dilakukan pada kondisi optimal, yaitu optikal densitas 10,2 dan menurunkan tegangan permukaan dari 72 dyne/Cm menjadi 27 dyne/Cm. Ini berarti kondisi optimum dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri sekaligus produksi biosurfaktan.

Parameter lingkungan yang dimaksud adalah pH, temperatur dan suplai oksigen melalui agitasi atau aerasi. Oleh sebab itu pada kesempatan ini kajian yang akan dilakukan adalah menentukan kondisi lingkungan terbaik untuk optimalisasi pertumbuhan dan penghasilan biosurfaktan menggunakan bakteri *Bacillus macerans* strain TS9-8.

2. Bahan dan Metoda

a. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan sejak bulan 01 September sampai dengan 25 November 2006, yang dilaksanakan di Laboratorium Biokimia jurusan Kimia, Universitas Riau..

b. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri seperti yang akan dijelaskan pada bagian-bagian di bawah ini. Peralatan yang digunakan untuk penelitian dan analisis antara lain, autoclave, incubator sheker, Elemeyer, spektrofotometer, sentrifuge, oven, timbangan analitik dan lain-lain.

c. Mikroorganisme

Bacillus macerans strain TS9-8 yang digunakan dalam kajian ini diambil dari program studi Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Kebangsaan Malaysia hasil isolasi oleh Murni, M. M. M. (1998). Bakteri ditumbuhkan pada nutrisi agar yang diinkubasi pada 30°C selama 24 jam. Stok kultur disimpan di dalam botol agar condong dan diletakkan di dalam ruangan dingin pada temperatur 4°C.

d. Medium Kultur

Medium yang digunakan adalah larutan Mineral Salt Medium (MSM) + gliserol merujuk kepada (Murni, M. M. M. (1998) dan Cooper D. G. et al. 1981) dengan komposisi sebagai berikut (M): 0,05 NH₄NO₃, 0.03 KH₂PO₄, 0.04 Na₂HPO₄, 8,0 x 10⁻⁴ MgSO₄, 7,0 x 10⁻⁶ CaCl₂, 4,0 x 10⁻⁶ FeSO₄, 4,0 x 10⁻⁴ EDTA, 1 % ekstrak yeast dan substrat gliserol sebagai sumber karbon adalah 2 % (Hasbi, M. dan Purwanto, E. 2003). Kisaran pH medium kultur adalah 6,8 – 7,2.

e. Inokulum untuk Prekultur

Satu loop bakteri *B. macerans* diambil dari stok kultur ditumbuhkan pada media Tryptone Soya Agar (TSA) selama 24 jam pada temperatur 30°C. Kemudian satu koloni *B. macerans* terpen cil dipindahkan secara aseptik ke dalam Erlenmeyer 500 ml yang berisi 50 ml media Mineral Salt Medium (MSM) + gliserol dan diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 30°C dengan kecepatan pengadukan 200 rpm.

f. Fermentasi menggunakan Erlenmeyer

Semua kajian dilakukan menggunakan incubator sheker yang dilengkapi dengan pengaturan temperature secara otomatis. Semua Fermentasi menggunakan Erlenmeyer volume 500 ml sebanyak 24 buah (d disesuaikan dengan kapasitas incubator sheker) . Yang penting disini setiap kali uji coba (running) dilakukan selama 24 jam. Pengukuran pertumbuhan setiap jam hanya dilakukan untuk percobaan awal pada kondisi lingkungan pH 6,8 ; temperature 30°C dan suplai oksigen 200 rpm. Tujuannya adalah mengetahui lamanya fermentasi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan produksi biosurfaktan yang optimum. Untuk selanjut pengukuran kedua variabel respon tersebut dilakukan sekali saja, yaitu diakhir fermentasi.

g. Pengukuran Tingkat Pertumbuhan dan Produksi Biosurfaktan Tingkat Pertumbuhan

Pengukuran absorbansi bertujuan untuk menentukan tingkat pertumbuhan bakteri secara tidak langsung. Pengukuran dengan metode ini lebih mudah dan praktis yang bisa dilakukan pengukuran setiap satu jam untuk memantau tingkat pertumbuhan bakteri. Sampel diambil dari media kultur dengan mikro pipet dimasukkan ke kuvet 1 ml lalu diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV (Shimadzu UV-265) pada panjang gelombang 600 nm.

h. Isolasi dan pemurnian produksi biosurfaktan

Diawali dengan memisahkan sel bakteri dari medium kultur dengan menggunakan sentrifuge (Sorvall RC-5C) pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Biomassa sel bakteri dibuang, supernatannya ditambahkan dengan asam HCl pekat sampai pH 2, lalu diaduk hingga homogen dan dibiarkan setengah jam. Endapan yang terbentuk merupakan biosurfaktan mentah, dipisahkan dengan sentrifuge dengan kecepatan yang sama selama 10 menit. Biosurfaktan yang diperoleh dikeringkan, dan ditimbang.

Metode Penelitian

a. Rancangan Perlakuan, Percobaan dan Analisis Data

Setiap faktor dimulai pada tiga titik berdasarkan pada titik optimum yang dilakukan oleh Carrera, P. et. al. (1992) yaitu pH sebesar 6,8; temperatur 30°C; dan suplai oksigen menggunakan inkubator sheker sebesar 200 rpm. Selanjutnya ditentukan titik atas dan titik bawah, sehingga setiap faktor terdiri dari tiga taraf seperti berikut:

- pH : ± 1,5 poin menjadi : 5,3 : 6,8 dan 8,3
- temperatur: ± 7 poin menjadi: 30 °C, 33,5 °C : dan 37 °C
- Suplai oksigen: 200 rpm (hanya satu taraf karena kerusakan pada pengaturan kecepatan)

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga faktor masing-masing tiga taraf yang setiap kombinasi perlakuannya diulang 3 kali. Faktor-faktor tersebut adalah :

Faktor P : pH Medium, terdiri dari : $p_0 = 5,3$: $p_1 = 6,8$: $p_2 = 8,3$

Faktor T : Temperatur Lingkungan, terdiri dari : $t_0 = 30^{\circ}\text{C}$: $t_1 = 33,5^{\circ}\text{C}$: $t_2 = 37^{\circ}\text{C}$

Faktor Oksigen : Suplai Oksigen hanya satu saja yaitu $O_0 =$ Putaran 200 rpm

Sehingga percobaan akan menjadi 27 satuan percobaan (3 x 3 x 1 x 3 ulangan).

Model matematis untuk Rancangan Acak Lengkap tersebut adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + T_j + O_k + (PT)_{ij} + (PO)_{ik} + (TO)_{jk} + (PTO)_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

dimana: Y_{ijk} = Variabel respon yang diamati (Pertumbuhan dan

Biosurfaktan)

μ = Rata-rata umum

P_i = Pengaruh pH medium pada taraf ke-i

T_j = Pengaruh Temperatur lingkungan pada taraf ke-j

O_k = Pengaruh Oksigen pada taraf ke-k

$(PT)_{ij}$ = Pengaruh interaksi antara faktor pH medium pada taraf ke-i dengan faktor Temperatur taraf ke-j

$(PO)_{ik}$ = Pengaruh interaksi antara faktor pH medium pada taraf ke-i dengan faktor Suplai Oksigen taraf ke-k

$(TO)_{jk}$ = Pengaruh interaksi antara faktor temperatur medium pada taraf ke-j dengan faktor suplai Oksigen taraf ke-k

$(PTO)_{ijk}$ = Pengaruh interaksi antara faktor pH medium pada taraf ke-i dengan faktor Temperatur taraf ke-j dan dengan faktor suplai Oksigen taraf ke-k.

ϵ_{ijk} = Efek unit eksperimen dalam satuan percobaan karena kombinasi perlakuan ke-ijk

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan dilakukan analisis ragam pada taraf uji 5% dan untuk melihat efek peningkatan pengujian faktor-faktor dalam antar taraf faktor, akan digunakan uji Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf uji 5%. Hasil pengamatan lain yang berupa data kualitatif akan dianalisis secara diskriptif (Sudjana, 1991).

b. Prosedur Penelitian

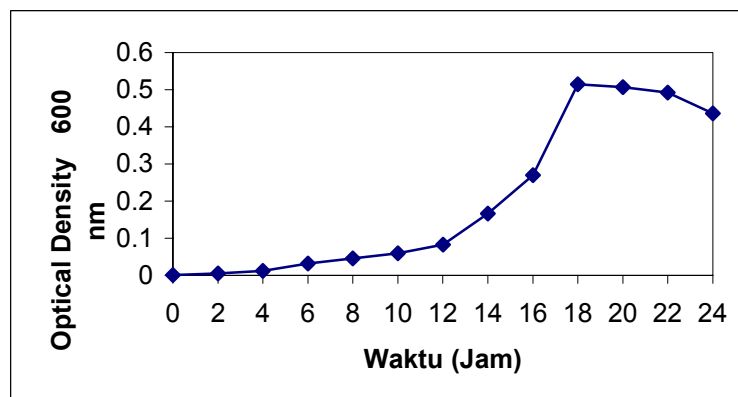
Variabel Respon yang diukur dalam percobaan ini adalah pertumbuhan bakteri dan produksi biosurfaktan dengan satuan gram/L. Prosedur penelitian dapat dijelaskan sebagai berikut; Setelah dilakukan pengacakan sesuai dengan rancangan percobaan masing-masing erlenmeyer yang berisi 50 ml medium steril, dimasukkan prekulturr sebanyak 0,5 ml secara aseptik. Kemudian diinkubasi selama proses fermentasi optimum pada suhu dan pecepatan pengadukan yang ditentukan sesuai rancangan. Tepat pada waktu yang telah ditetapkan sebagai akhir fermentasi, diukur pertumbuhan dan produksinya sebagaimana yang dijelaskan di atas.

3. Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan *Bacillus macerans* ST 9-8

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan yang mencakup semua penyusun kimia sel, baik pertambahan ukuran sel maupun jumlah sel yang dapat diukur dengan jumlah massa berat kering. Pengukuran juga dapat dilakukan secara tidak langsung dengan mengukur absorbansi dari hasil fermentasi dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Pada Gambar 1. dapat dilihat pertumbuhan bakteri yang diinkubasi pada suhu 30°C pH 6,8 dan pengadukan sebagai suplai oksigen 200 rpm. Pertumbuhan yang lambat dari nol jam hingga 12 jam, setelah itu pertumbuhannya naik drastic hingga titik puncak pada jam ke 18 jam. Pertumbuhan mengalami masa stabil selama tiga jam berikutnya dan akhirnya menurun hingga akhir fermentasi jam ke 24. Pola pertumbuhan bakteri sering menunjukkan tren yang sama yang terdiri dari empat fase yaitu log phase (fase diam), logaritma phase (fase pertumbuhan cepat), stationary phase (fase stabil/tetap) dan death phase (fase kematian). Prekulturr yang digunakan adalah kultur yang telah diinkubasi selama 24 jam sebagaimana terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pertumbuhan Bakteri *Bacillus macerans* ST 9-8 yang Diinkubasi pada Suhu 30°C, pH 6,8 dan Pengadukan 200 rpm Selama 24 jam

Peningkatan Produksi Biosurfaktan

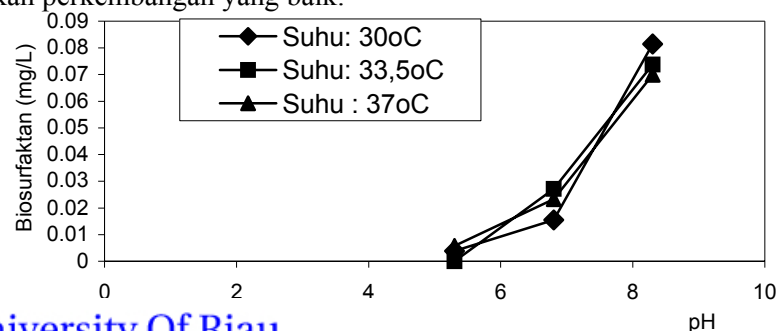
Produksi biosurfaktan hasil kajian percobaan factorial dengan tiga factor masing-masing tiga taraf untuk pH dan Suhu, dengan kecepatan suplai oksigen hanya satu taraf dapat dilihat pada Tabel 1,

Tabel 1. Hasil Rata-rata Produksi Biosurfaktan dan Pertumbuhan Bakteri *Bacillus macerans*

pH	30°C		33,5°C		37°C	
	Hasil Mg/L	Pertumbuhan (Absorban)	Hasil Mg/L	Pertumbuhan (Absorban)	Hasil Mg/L	Pertumbuhan (Absorban)
5,3	0.0039	0.72	0.0001	0.49	0.0058	0.52
6,8	0.0155	0.96	0.0272	0.74	0.0233	0.81
8,3	0.0815	0.543	0.0738	0.53	0.0699	0.24

Catatan: agitasi sebagaipensuplai oksigen: 200 rpm

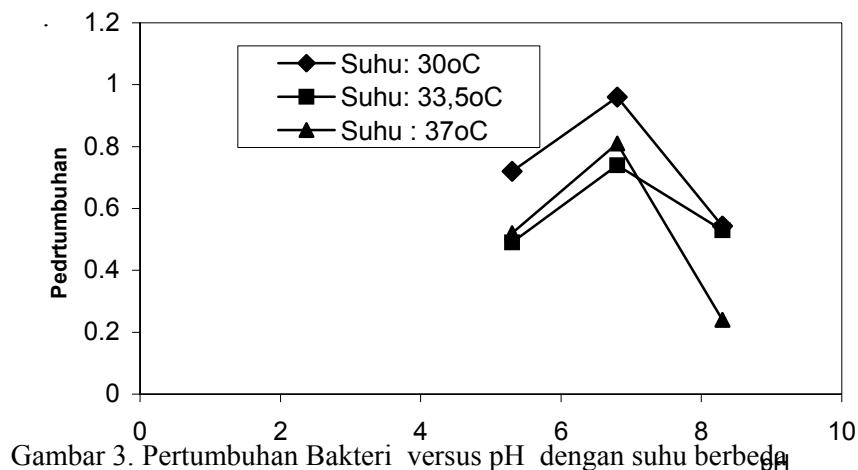
Hasil analisis uji DNMRT 5% terhadap produksi Surfaktan menunjukkan bahwa interaksi antara perlakuan pH dan suhu memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan produksi (Lihat lampiran 1.), dimana taraf pH 8,3 dengan suhu 30°C memberikan hasil yang paling tinggi sebesar 0.0836 mg/L meningkat 5,4 kali dari perlakuan nol (pH 6,8 dan suhu 30°C). Pada Gambar 2. memperlihatkan interaksi suhu dengan pH terhadap produksi biosurfaktan. Kenaikan pH memberikan peningkatan produksi biosurfaktan dimana pada pH 8,3 memberikan produksi yang paling tinggi untuk setiap perlakuan suhu. Hal ini menunjukkan bahwa suasana alkalis sangat sesuai untuk menstimulan produksi biosurfaktan, walaupun pertumbuhan bakteri tidak menunjukkan perkembangan yang baik.



Gambar 2. Produksi Biosurfaktan versus pH dengan suhu berbeda

Pengaruh Perlakuan Terhadap Pertumbuhan Bakteri

Hasil analisis uji DNMRT 5% terhadap Pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa interaksi antara perlakuan pH dan suhu memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan pertumbuhan (Lihat lampiran 2.), Demikian juga pH rendah atau suasana asam mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri. Jadi suasana terlalu asam dan terlalu alkalis dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Sementara peningkatan suhu juga mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri. Jadi pertumbuhan yang baik dapat terjadi pada suhu 30°C dan pH relatif netral yaitu 6,8 – 7,2. Pada Gambar 3. memperlihatkan interaksi suhu dengan pH terhadap Pertumbuhan bakteri, dimana suasana asam dan alkalis tidak baik bagi pertumbuhan bakteri.



4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis uji DNMRT 5% menunjukkan bahwa interaksi antara suhu dan pH berpengaruh sangat nyata terhadap produksi biosurfaktan dimana taraf pH 8,3 dengan suhu 30°C memberikan hasil yang paling tinggi sebesar 0.0836 mg/L meningkat 5,4 kali dari perlakuan nol. Sebaliknya interaksi yang sama memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan pertumbuhan bakteri *Bacillus macerans* Strain ST9-8.

Ucapan terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian UNRI, karena atas pemberian dana penelitian melalui Dana Dikti DP2M Jakarta 2006 hasil penelitian dan artikel ini dapat diselesaikan.

Daftar Pustaka

- Banat, I. M., 1995. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: A Review. *Bioresource Technology*. S1 pp 1-12.
- Carerra, P., Cosmina, P., & Grandi, G. 1992. A Mutant of *Bacillus subtilis* and a Method of Producing Surfactin With the Use of the Mutant. European Patent Application (EPA).
- Canny, G. and Broaders, M. 1999. Clean up of oil spillages using biosurfactant. *The Irish Scientist*. Institute of Technology, Sligo.
- Feliartra. 2002. *Implementasi dan Pengembangan Bioteknologi Kelautan Dalam Upaya Optimalisasi Pemanfaatan Laut Indonesia*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau, 5 November 2002. Pekanbaru.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: Moving to Wards Industrial Application. *Tib. Tech.* Vol. 10. pp. 208-217.
- Georgiou, G., Lin, S.C. and Sharma, M.M., 1992. Surface -Active Compound s from Microorganisms. *Bio/Technology* Vol.10: pp. 60 - 65.
- Hasbi, M. dan Perwanto, E. 2003. Penentuan Konsentrasi Substrat Terbaik Untuk Pertumbuhan Bakteri *Bacillus macerans* ST9-8 yang Memproduksi Biosurfaktan. Makalah disampaikan pada Seminar Bioteknologi Se-Sumatera di Fakultas Kedokteran Unri 12 – 13 Desember 2003
- Kosaric,N. 1992. Biosurfactants in Industry., *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 64. (11) : 1731 - 1737.
- Lin, S. C.et. al. 1994. Structural and Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Application Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 60, No. 1. pp. 31-38.
- Murni, M.M.M. 1998. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria and Characterization of the Biosurfactant Produced by One of the Isolates. Ph.D. Thesis, Unoversiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor

Lampiran 1. Hasil analisis uji DNMRT 5% terhadap produksi Surfaktan

Sumber Keragaman	dB	JK	RJK	F hit	F tabel
Perlakuan	8	0.0209	0.0026	328.5204 *	2.51 3.71
Faktor pH	2	0.0152	0.0076	956.0891 *	3.55 6.01
Faktor Temp.	2	0.0015	0.0007	92.0084 *	3.55 6.01
Interaksi	4	0.0042	0.0011	132.9921 *	2.93 4.58
Galat	18	0.0001	0.00001		
Total	26	0.0210			

Lampiran 2. Hasil analisis uji DNMRT 5% terhadap Pertumbuhan

Sumber Keragaman	dB	JK	RJK	F hit	F tabel
Perlakuan	8	2.4477	0.3060	20.6998 *	2.51 3.71
Faktor pH	2	0.1223	0.0611	4.1359 *	3.55 6.01

Faktor Temp	2	1.9491	0.9745	65.9328 *	3.55	6.01
Interaksi	4	0.3763	0.0941	6.3653 *	2.93	4.58
Galat	18	0.2661	0.0148			
Total	26	2.7137				



Filename: Makalah_m hasbi
Directory: F:
Template: C:\Documents and Settings\bundo\Application
Data\Microsoft\Templates\Normal.dot
Title: PENENTUAN KONSENTRASI SUBSTRAT
TERBAIK UNTUK PERTUMBUHAN BAKTERI BACILLUS
MACERAN STRAIN TS9-8 YANG MEMPRODUKSI
BIOSURFEKTAN
Subject:
Author: User
Keywords:
Comments:
Creation Date: 28/11/2006 09:04:00
Change Number: 5
Last Saved On: 02/12/2006 14:35:00
Last Saved By: bundo
Total Editing Time: 24 Minutes
Last Printed On: 02/12/2006 14:40:00
As of Last Complete Printing
Number of Pages: 8
Number of Words: 2.844 (approx.)
Number of Characters: 16.211 (approx.)

