

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Juni s/d November 2007, di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA. Jika dalam pelaksanaannya terdapat kendala peralatan dan atau kerusakan, maka pelaksanaannya dapat merujuk ke laboratoruim yang kompeten seperti laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi LEMIGAS Jakarta.

3.2. 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, Tensiomat untuk tegangan permukaan , oven, timbangan analitik dan lain-lain.

3.3. Sampling Mikroorganisme

Bakteri penghasil biosurfaktan diambil dari kolam penampungan dan pemisahan air limbah dan minyak mentah pada Gathering Station (GS) dan atau kolam Centralized Land Treatment Support (CLTS)/ Central Mud Treatment Facility (CLTF) PT. Bumi Siak Pusako Zamrud Kabupaten Siak Sri Indrapura Propinsi Riau. Caranya adalah dengan mengambil air permukaan yang tercemar oleh minyak mentah dan lumpur atau tanah tepi kolam yang terkontaminasi oleh minyak mentah. Baik air maupun lumpur dan tanah masing-masing diambil

sebanyak empat titik sampling yang diambil secara acak pada masing-masing sisi kolam. Selanjutnya sample tersebut dikompositkan, sehingga diperoleh dua sample dari hasil sampling yaitu air dan lumpur atau tanah. Kedua sample tersebut ditempatkan pada wadah kaca yang telah disediakan sebelumnya.

3.4. Isolasi Mikroorganisme

Masing-masing sample air dan Lumpur dan tanah diberi perlakuan sebagai berikut. Sampel air diencerkan hingga menjadi 10^{-3} kali secara aseptik (steril) dengan larutan 0,85% Natrium Chlorida steril. Sampel tanah atau Lumpur diambil satu gram dihaluskan dengan lumpang penggrus bersih dan steril, kemudian diencerkan hingga menjadi 10^{-4} kali secara aseptik (steril) dengan larutan 0,85% Natrium Chlorida steril. Masing-masing sample yang telah diencerkan tersebut dituangkan sebanyak satu ml ke Oxoid Tryptone Soya Agar (TSA). Bakteri yang tumbuh pada piring agar TSA dicoretkan beberapa kali pada piring TSA untuk memisahkan koloni murni untuk subkultur dan penyaringan lebih lanjut. Bakteri murni disimpan pada agar condong TSA pada refrigator pada ruang dingin dengan memberi kode masing-masing biakan murni yang telah diperoleh.

3.5. Penentuan Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Ada beberapa cara dalam menentukan bakteri penghasil biosurfaktan. Diantara yang mudah adalah dengan mengukur penurunan Tegangan Permukaan hasil fermentasi masing-masing bakteri sebagaimana yang dilakukan oleh Hisatsuka *et al.* (1971), Cooper *et al.* (1981) dan Phale *et al.* (1995). Dilaporkan bahwa bacaan 50 mN/m sebagai batas atas hingga lebih rendah menunjukkan

bakteri tersebut menghasilkan biosurfaktan. Cara pengukuran tegangan permukaan lebih rinci dapat pada halaman 16.

Cara kedua untuk menentukan bakteri penghasil biosurfaktan dengan biosurfaktan assay aktivitas yaitu **Aktivitas Haemolisis**. Caranya adalah semua isolat murni ditumbuhkan pada media blood agar yang mengandung 5% (v/v) darah manusia dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 - 48 jam. Aktivitas haemolisis ditandai dengan terlihatnya zona bening disekitar satu koloni isolat murni (Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007). Hal ini sebagai penduga kuat bahwa bakteri isalat murni tersebut dapat menghasilkan biosurfaktan.

Cara ketiga untuk menentukan bakteeri penghasil biosurfaktan dengan **mengukur banyaknya Emulsi** yang terbentuk dengan mengambil 5 ml supernatan hasil fermentasi ke dalam tabung reaksi dan dikocok dengan kuat selama 2 menit. Selanjutnya dibiarkan selama 5 menit hingga foam yang terbentuk stabil, dan diukur tinggi foamnya. Aktivitas emulsifikasi didefenisikan sebagai tingginya lapisan emulsi (busa/foam) dibagi dengan tinggi awal sampel yang dinyatakan sebagai persentase (Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007). .

Uji yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dua metoda terakhir yaitu **Aktivitas Haemolosis dan Aktivitas Emulsifikasi**.

3.6. Medium Kultur

Ada beberapa jenis medium yang digunakan dalam kajian ini antara lain: 1) Larutan 0,85% Natrium Chlorida (NaCl) ; 2) Tryptone Soya Agar (TSA); 3) Blood Agar (BA) dan 4) 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 NH_4NO_3 , 0,03 KH_2PO_4 , 0,04 Na_2HPO_4 , $8,0 \times 10^{-4}$ MgSO_4 , $7,0 \times 10^{-6}$ CaCl_2 , $4,0 \times 10^{-6}$ FeSO_4 , $4,0 \times 10^{-4}$ EDTA, 1 % ekstrak yeast dan substrat gliserol sebagai sumber karbon 2 % (Purwanto, E. dan Hasbi, M. 2003). Kisaran pH medium kultur adalah 6,8 – 7,2.

3.7. Inokulum untuk Prekultur

Satu loop bakteri biakan murni diambil dari masing-masing stok kultur isolat murni yang diperoleh dari sampel air dan tanah, ditumbuhkan pada media Tryptone Soya Agar (TSA) selama 24 jam pada temperatur 30°C. Kemudian satu koloni terpicil dipindahkan secara aseptik ke dalam Erlenmeyer 100 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. Kultur ini merupakan prekultur untuk fermentasi penghasil biosurfaktan.

3.8. Fermentasi Penghasil Biosurfaktan

Setiap bakteri biakan murni hasil isolasi setelah persiapan prekultur, disiapkan Erlenmeyer volume 100 ml sebanyak jumlah isolat yang didapat dari sampel air maupun tanah. (8 buah untuk isolat dari sampel air dan 8 buah untuk isolat dari sampel tanah), masing-masing berisi 50 ml larutan media Mineral Salt Medium MSM ditambah 2% gliserol yang telah disterilkan selama 15 menit dengan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atm. Masing-masingnya dimasukkan prekultur sebanyak satu ml secara aseptik. Selanjutnya diinkubasi menggunakan incubator shaker pada temperatur kamar dengan kecepatan pengadukan 200 rpm selama 24 - 48 jam. Hasil fermentasi dianalisis untuk

mengetahui produksi biosurfektan menggunakan metode Aktiivitas Haemolisis dan aktivitas Emulsifikasi.

3.9. Pengumpulan dan Analisis Data

Hasil kajian ini akan memperoleh dua kelompok data yaitu; 1) Kelompok bakteri yang tidak menghasilkan biosurfektan dan 2) Kelompok bakteri yang menghasilkan biosurfektan. Kelompok bakteri yang menghasilkan biosurfektan ditandai oleh terbentuk zona bening disekitar koloni bakteri yang diuji melalui aktivitas haemofisis, dan uji aktivitas emulsifikasi.. Analisis data dilakukan dengan deskriptif, artinya data yang diperoleh akan diulas dalam bentuk naratif dengan berpedoman kepada rujukan yang ada. Kesimpulan yang akan diperoleh adalah ada atau tidaknya bakteri penghasil biosurfektan. Adapun nama dan jenis bakteri yang menghasilkan biosurfektan belum dapat ditentukan pada penelitian ini. Hal ini disebabkan keterbatasan dana untuk analisis baik untuk bakteri maupun identifikasi lanjut terhadap biosurfektan yang dihasilkan. Oleh sebab itu kajian ini dibatasi hingga diperoleh jumlah bakteri yang mampu menghasilkan biosurfektan saja.