

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA-UNRI. Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan November 2007 sampai Mei 2008.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, Ose, lampu spiritus, oven, autoklaf, *shaker*, vortex, mikroskop, inkubator, alat pengukur tegangan permukaan, *hot plate*, mikropipet, aluminium foil, kapas dan kassa. Adapun bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah Medium *Trypton Soya Agar* (TSA) (Merck), *Blood Agar* (Merck), Mineral Salt Medium (MSM) dan minyak tanah (kerosin) .

3.3 Metode Penelitian

Pengambilan sampel tanah yang terkontaminasi minyak bumi diambil dari kolam tempat pembuangan limbah minyak bumi dari lokasi eksplorasi pengeboran atau Gathering Station di PT. BSP yang dinamakan Centralized Land Treatment Support (CLTS) PT.. Bumi Siak Pusako, Propinsi Riau, dengan luas kira-kira 4 m x 10 m yang letaknya saling berdekatan. Masing-masing kolam dijadikan stasiun pengambilan sampel sehingga terdapat dua stasiun pengambilan sampel. Sampel diambil pada masing-masing stasiun dengan tiga titik sampel. Sampel dikompositkan berdasarkan stasiun. Pengambilan sampel menggunakan

metode *purposive sampling*. Nantinya dari sampel tanah ini diisolasi semua jenis bakteri, dan selanjutnya diskriminasi bakteri penghasil biosurfaktan.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil sebanyak 0,25 kg dari 1 kolam tanah yang mengandung limbah minyak bumi di PT. Bumi Siak Pusako Zamrud. Sampel diambil secara acak pada 2 stasiun masing-masing stasiun dengan 3 titik sampel. Sampel tanah dikompositkan berdasarkan stasiun dan dimasukkan ke dalam botol kaca yang sudah disterilkan terlebih dahulu. Kemudian disimpan ke dalam refrigerator (suhu 4°C) sebelum isolasi dikerjakan.

3.4.2. Penyiapan Medium

3.4.2.1. Media *Tryptone Soya Agar* (TSA)

Media isolasi adalah medium TSA, untuk mengisolasi bakteri penghasil biosurfaktan. Medium ini dibuat dengan mencampurkan 40 g TSA (Merck) ke dalam 1 liter aquades steril, lalu dididihkan sampai larut dan diaduk sampai homogen. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit, pH media = 7,3 (Murni, 1998)

3.4.2.2 Media *Blood Agar*

Media *Blood Agar* digunakan untuk skrining bakteri yang memiliki sifat mampu menghemolisis sel darah merah. Medium ini dibuat dengan mencampurkan 40 g *Blood Agar* (Merck) ke dalam 1 liter aquades steril, lalu dididihkan sampai larut dan diaduk sampai homogen. Sterilisasi dilakukan dengan

autoklaf pada 121° C tekanan 15 psi selama 15 menit, pH media = 6,8. Setelah itu media didinginkan sampai 45° C dan ditambahkan darah biri-biri yang sudah defibrinasi (Jenning *et al*, 2000).

3.4.2.3 Media Mineral Salt Medium (MSM)

Media MSM digunakan untuk media fermentasi bakteri penghasil biosurfaktan. Komposisi media adalah NH_4NO_3 0,05 g, KH_2PO_4 0,03 g, Na_2HPO_4 0,04 g, MgSO_4 , CaCl_2 , FeSO_4 , Na_2 EDTA, Yeast extract 0,1 %, dan gliserol 2 %. Semua bahan tersebut dilarutkan dalam 1 liter aquades steril, lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit, pH media = 6,7-7,2 (Cooper *et al*, 1981; Kofli *et al*, 2000).

3.5. Isolasi Bakteri dari Tanah Sampel

Isolasi bakteri dari sampel tanah dilakukan dengan mengambil 1 gram tanah yang tercemar minyak bumi yang berasal dari PT. BSP. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,85 % steril. Larutan NaCl steril yang telah mengandung sampel diencerkan sampai dengan pengenceran 10^{-4} dan divorteks untuk menghomogenkan sampel dengan larutan NaCl. Pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} diinokulasikan ke dalam media TSA (Merck) dengan metode *pour plate*. Setelah itu diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh dimurnikan lagi pada media TSA sehingga didapatkan koloni tunggal. Isolat murni disimpan/dipelihara pada agar miring TSA dan diletakkan dalam refrigerator.

3.6. Skrining Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Semua isolat bakteri murni yang dipelihara dari media TSA diseleksi untuk memperoleh bakteri penghasil biosurfaktan. Masing-masing isolat ditotolkan pada media *Blood Agar* untuk menentukan bakteri yang mampu menghemolisis sel darah merah. Setelah itu diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Bakteri yang mampu menghemolisis sel darah merah ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni. Kemudian zona bening diukur (Jenning *et al*, 2000). Bakteri yang dapat menghemolisis sel darah merah dijadikan sebagai penduga terhadap bakteri penghasil biosurfaktan.

3.7. Penyiapan inokulum untuk uji Fermentasi

Sebelum fermentasi untuk uji emulsifikasi dilakukan, terlebih dulu disiapkan prekulturan dengan mengambil satu ose (*loop*) isolate murni dari stok kultur ditumbuhkan ke dalam 50 ml larutan media MSM dan diinkubasi selama 24 jam dengan incubator shaker kecepatan 200 rpm pada temperatur kamar. Kemudian dihitung total koloni nya dengan metode TPC (*Total Plate Count*) menggunakan alat *Colony Counter* sampai mencapai populasi 10^6 (Tabatabaee *et al*, 2005).

3.8. Uji Fermentasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Isolat bakteri dari persiapan prekulturan dipindahkan sebanyak 1 ml (populasi 10^6) secara aseptis ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang telah berisi 50 ml larutan MSM ditambah gliserol 2 %. Selanjutnya difermentasikan dengan menggunakan incubator shaker pada temperatur kamar dan kecepatan 200 rpm

selama 3 hari. Bakteri yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan ditandai dengan terbentuknya busa (*foam*) pada larutan fermentasi. (Tabatabaee *et al* 2005).

3.9. Uji Emulsifikasi

Uji emulsifikasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam mengemulsi lapisan lemak. Dalam penelitian ini digunakan kerosene sebagai substrat lemak yang akan diemulsi.. Perbandingan antara kerosene dan kultur cair adalah 6: 4. Dimasukkan 6 ml kerosene ke dalam testube setelah itu ditambahkan kultur cair 4 ml hasil fermentasi, kemudian divorteks dengan kecepatan tinggi selama 2 menit. Setelah itu didiamkan selama 24 jam untuk melihat kestabilan emulsi. Kemudian diukur indeks emulsifikasi dengan menggunakan rumus Cooper dan Goldenberg (1987).

Untuk menghitung indeks emulsifikasi, digunakan rumus sebagai berikut:

$$IE_{24} = \frac{\text{Tinggi Lapisan Emulsi}}{\text{Tinggi lapisan minyak} + \text{lap. emulsi}} \times 100\%$$

3.10. Pengamatan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah dua kelompok bakteri yaitu bakteri yang menghasilkan biosurfaktan dan bakteri yang tidak menghasilkan biosurfaktan melalui uji hemolisis dan uji emulsifikasi yang ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar. Kemudian diuraikan dalam bentuk naratif deskriptif untuk mendapatkan kesimpulan.