

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil

#### 4.1.1. Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah

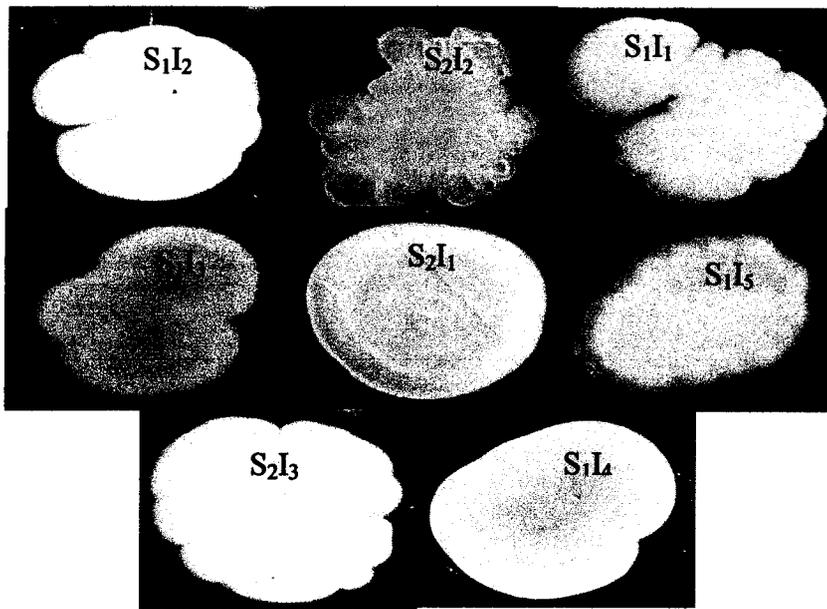
Hasil penseleksian dan pengisolasian bakteri dari sampel tanah atau lumpur telah diperoleh isolasi-isolat murni. Stasiun I ditemukan lima isolate, sedangkan Stasiun II ditemukan tiga isolate. Kesemua hasil isolasi dan pemurnian bakteri dari sampel tanah diberi kode sebagaimana yang ditampilkan pada Tabel 1. dan Gambar 1.

Tabel 1. Hasil Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah

NO	STASIUN	KODE ISOLAT
1	I	S1I <sub>1</sub>
2	I	S1I <sub>2</sub>
3	I	S1I <sub>3</sub>
4	I	S1I <sub>4</sub>
5	I	S1I <sub>5</sub>
6	II	S2I <sub>1</sub>
7	II	S2I <sub>2</sub>
8	II	S2I <sub>3</sub>

Keterangan : S= Stasiun, Angka: Stasiun ke ... ; I= Isolat, Angka: isolat ke ...

Secara visual kondisi lingkungan kedua stasiun tidak berbeda. Namun apabila diperhatikan dari data kualitas fisika kimia lingkungan kedua Stasiun terdapat perbedaan terutama suhu. Perbedaannya sangat nyata dimana pada Stasiun I suhu 31°C dan pada Stasiun II suhu lingkungannya 40°C. Hal ini diduga memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan jumlah jenis bakteri saat pengkulturan, dimana suhu pengkulturan tidak dapat diatur sedemikian rupa menyamai kondisi lingkungan aslinya karena keterbatasan peralatan yang tidak tersedia.



Gambar 1. Hasil Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah

Oleh sebab suhu inkubasi selama masa pertumbuhan di laboratorium adalah suhu ruang yang berkisar antara 25-28°C dan kisaran suhu ini yang digunakan selama penelitian khususnya penggunaan alat incubator sheker yang tidak memiliki pengaturan temperature. Pada Tabel 2. dapat dilihat jumlah isolate bakteri dan perbedaan kondisi lingkungan hasil pengukuran lapangan.

Tabel 2. Parameter Lingkungan Tempat Sampling di CLTS dan Jumlah Isolat Bakteri yang Diperoleh

Kolam/stasiun	Jumlah isolate	Suhu Lingkungan (°C)	pH Tanah
I	5	31	8,6
II	3	40	8,4

#### 4.1.2. Seleksi Isolat Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Seleksi isolate bakteri penghasil biosurfaktan dapat dilakukan dengan beberapa metode. Pada penelitian ini hanya menggunakan dua metode yaitu

dengan uji aktivitas haemolisis dan aktivitas emulsi dengan tes emulsifikasi. Uji emulsifikasi merupakan uji lebih spesifik dalam menentukan bakteri penghasil biosurfaktan. Sedangkan uji hemolisis merupakan cara yang paling mudah dan paling cepat untuk menduga awal bakteri penghasil biosurfaktan (Jennings dan Tanner, 2000).

#### 4.1.2.1. Uji Hemolisis

Semua hasil isolasi bakteri dari sampel tanah yang tumbuh di media TSA, diseleksi dengan metode hemolisis menggunakan media *Blood Agar*. Metode uji hemolisis merupakan kemampuan bakteri menghemolisis sel darah merah pada *Blood Agar Plate* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni (Chamanrokh *et al*, 2007). Hasil uji ini diperoleh sebanyak empat isolate bakteri yang mampu menghemolisis sel darah merah (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil Uji Hemolisis yang Terbentuk oleh Isolat Bakteri

No	Stasiun	Kode Isolat	Ø Zona Bening (Cm)	Jenis Hemolisis	
				Jenis	Warna
1	I	S1I <sub>1</sub>	-	-	-
2	I	S1I <sub>2</sub>	-	-	-
3	I	S1I <sub>3</sub>	-	-	-
4	I	S1I <sub>4</sub>	2,2	β	Bening
5	I	S1I <sub>5</sub>	1,5	α	Hijau
6	II	S2I <sub>1</sub>	1,5	β	Bening
7	II	S2I <sub>2</sub>	-	-	-
8	II	S2I <sub>3</sub>	2,0	β	Bening

#### 4.1.2.2. Fermentasi dan Uji Emulsifikasi

Masing-masing prekulturr isolate murni dihitung populasinya dengan metode TPC (*Total Plate Count*) menggunakan alat *Colony Counter* agar setiap

ml kultur yang akan diuji memiliki populasi yang sama yaitu sama-sama berada pada populasi  $10^6$ . Jumlah koloni dari masing-masing isolate yang akan difermentasikan dan selanjutnya dilakukan uji emulsifikasi (Tabel Tabel 4).

Tabel 4. Jumlah Koloni masing-masing Isolat untuk Fermentasi

Kode Isolat	Pangkat Pengenceran	Jumlah Koloni	Jumlah sel /ml
S1I <sub>1</sub>	$10^{-6}$	43	$43 \times 10^6$
S1I <sub>2</sub>	$10^{-6}$	56	$56 \times 10^6$
S1I <sub>3</sub>	$10^{-6}$	37	$37 \times 10^6$
S1I <sub>4</sub>	$10^{-6}$	46	$46 \times 10^6$
S1I <sub>5</sub>	$10^{-6}$	46	$46 \times 10^6$
S2I <sub>1</sub>	$10^{-6}$	88	$88 \times 10^6$
S2I <sub>2</sub>	$10^{-6}$	65	$65 \times 10^6$
S2I <sub>3</sub>	$10^{-6}$	78	$78 \times 10^6$

Uji penentuan bakteri penghasil biosurfaktan berikutnya adalah uji emulsifikasi. Uji ini lebih spesifik dan akurat untuk menentukan bakteri penghasil biosurfaktan, walaupun prosesnya butuh waktu lebih lama dibandingkan uji hemolisis. Hasil fermentasi yang dilakukan menggunakan incubator shekker pada suhu kamar dan kecepatan agitasi 200 rpm selama tiga kali 24 jam, selanjutnya masing-masing larutan kulturnya dilakukan uji emulsifikasi sesuai prosedur 3.9. Hasil uji emulsifikasi dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Emulsifikasi

Kode Isolat	Kerosen (cm)	Lapisan Emulsi (cm)	Indeks Emulsifikasi (%)
S1I <sub>1</sub>	0,5	1,7	77,3
S1I <sub>2</sub>	2,4	2,2	47,8
S1I <sub>3</sub>	0,2	2	91
S1I <sub>4</sub>	0	2,5	100
S1I <sub>5</sub>	0,5	2,3	82
S2I <sub>1</sub>	0,1	2	95
S2I <sub>2</sub>	0,7	2,8	80
S2I <sub>3</sub>	0	2,3	100
Kontrol	4	0	-

## **4.2. Pembahasan**

### **4.2.1. Jumlah Isolat Bakteri**

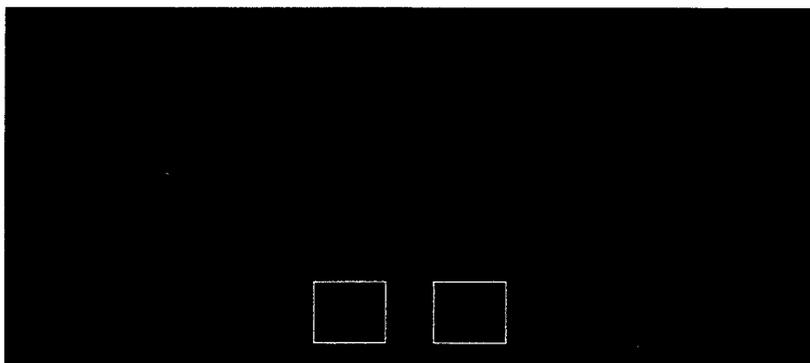
Jumlah isolate bakteri yang diperoleh dari sampel tanah di PT. BSP Riau adalah sebanyak delapan isolate, lima isolate ditemukan dari sample Stasiun I dan tiga isolate dari sample Stasiun II. Jumlah isolate yang ditemukan tersebut lebih sedikit dibandingkan dengan hasil penelitian Agustiani (2004) sebanyak 23 isolat bakteri khususnya pada Stasiun II. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh faktor lingkungan fisika. Agustiani (2004) mengkulturkan bakteri pada suhu 50° C selama masa inkubasi pada suhu yang sesuai atau sama dengan kondisi lingkungan sample yang diambilnya pada sumur minyak bumi di Rumbai Riau. Adapun suhu lingkungan tempat pengambilan sample Stasiun I 31° C dan Stasiun II 40° C, dua kondisi lingkungan yang berbeda. Suhu inkubasi isolasi bakteri dilakukan pada suhu kamar berkisar antara 25 – 28° C, berbeda dengan suhu lingkungan yang sebenarnya. Gambar 1, menunjukkan bahwa semua kedelapan isolate hasil isolasi tersebut tidak ada yang sama baik dari warna, bentuk tepian dan sifat melekat dan keadaan permukaannya.

Faktor keterbatasan peralatan laboratorium merupakan pembatas, dimana incubator shaker yang digunakan tidak mempunyai pengaturan suhu, sehingga suhu inkubasi dilakukan pada suhu kamar. Faktor inilah yang diduga penyebab tidak optimalnya pertumbuhan dan jumlah bakteri yang diperoleh.

## 4.2.2. Seleksi Isolat Bakteri Penghasil Biosurfaktan

### 4.2.2.1. Uji Hemolisis

Terdapat empat jenis isolat yang positif dengan uji hemolisis ditandai terbentuknya zona bening disekitar koloni isolate tersebut. Isolat S1I<sub>4</sub> diameter zona beningnya 2,2 cm, isolat S2I<sub>3</sub> diameter 2 cm, S2I<sub>1</sub> diameter 1,5 cm dan isolat S1I<sub>5</sub> memiliki diameter zona bening 1,5 cm. Isolat S1I<sub>4</sub>, S2I<sub>3</sub> dan S2I<sub>1</sub> dikelompokkan dalam hemolisis beta, yaitu mampu menghemolisis seluruh sel darah merah yang ada pada media sehingga warna disekeliling koloni menjadi bening (Gambar 2. a.). Isolat S1I<sub>5</sub> masuk dalam kelompok hemolisis alpha karena hanya mampu menghemolisis sebagian sel darah merah yang ada pada media sehingga warna di sekeliling koloni menjadi berwarna hijau (Gambar 2. b.). Warna hijau disekeliling koloni disebabkan oleh adanya biliverdin yang merupakan produk dari hemoglobin yang terdegradasi (Anonim, 2007). Sedangkan 4 isolat lainnya tidak mampu menghemolisis sel darah merah pada media *Blood Agar*. Keempat isolat ini dapat dikelompokkan dalam gama hemolisis, yaitu tidak melakukan hemolisis sama sekali.



Gambar 2: (a) menunjukkan beta hemolisis, tampak disekeliling koloni berwarna bening dan gambar (b) alpa hemolisis disekeliling koloni berwarna hijau. Gambar diambil dengan menggunakan camera digital 5 megapixel.

Hasil penelitian Daud *et al* (2005) di Malaysia mengatakan bahwa bakteri yang mengalami beta hemolisis merupakan bakteri yang paling berpotensi untuk menghasilkan biosurfaktan. Pernyataan ini dikuatkan oleh penelitian Ni'matuzahroh (1999) yang memperoleh isolat bakteri *Pseudomonas* sp. dari kawasan perairan pantai Surabaya dengan kemampuan tipe hemolisis beta. Sedangkan pada penelitian Agustiani (2004) diketahui bahwa dari 15 isolat yang menunjukkan hasil hemolisis positif, 12 diantaranya adalah bakteri penghasil biosurfaktan, berarti yang tidak menunjukkan aktifitas hemolitik ternyata tidak menghasilkan biosurfaktan.

Walaupun hasil uji hemolisis positif untuk empat isolate sebagai penduga terhadap isolat penghasil biosurfaktan, akan tetapi perlu dilakukan uji lain sebagai penguat dalam penentuan bakteri penghasil biosurfaktan tersebut. Karena hasil kajian (Youssef, N.H. *et. al.* 2004) tentang perbandingan metode mendeteksi bakteri biosurfaktan menyimpulkan bahwa metode hemolisis menunjukkan korelasi yang sangat lemah terhadap metode penurunan tegangan permukaan. Oleh sebab itu metode ini tidak dapat dipercaya untuk mendeteksi bakteri penghasil biosurfaktan.

#### **4.2.2.2. Uji Emulsifikasi**

Sebagaimana yang terlihat pada Tabel 5, hasil uji emulsifikasi menunjukkan hasil yang berbeda dengan metode lisis. Semua isolat yang diuji dengan metode uji emulsifikasi menunjukkan nilai positif, artinya semua isolate dapat menghasilkan biosurfaktan dengan persentase yang berbeda-beda. Banyaknya emulsi stabil yang terbentuk mengindikasikan jumlah biosurfaktan yang dihasilkan isolat tersebut. Ditemukan dua isolate yang menghasilkan paling

banyak yaitu isolat S1I<sub>4</sub> dan S2I<sub>3</sub> dengan Indeks Emulsifikasi 100%, artinya semua hidrokarbon yang dimasukkan dalam media uji dapat diemulsikan sempurna. Isolat S1I<sub>2</sub> merupakan penghasil emulsi paling rendah yaitu 47,8%, berarti biosurfaktan yang dihasilkannya juga rendah. Hal menarik yang dapat dijelaskan dari isolate yang positif uji lisis bila dihubungkan dengan indeks Emulsi adalah bahwa isolate yang positif dengan uji lisis menunjukkan nilai Indeks Emulsi (IE<sub>24</sub>) cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan isolate nilai negative, sekaligus menunjukkan isolate tersebut menghasilkan biosurfaktan lebih banyak. Isolat positif dengan uji lisis jenis beta ( $\beta$ ) merupakan penghasil biosurfaktan tertinggi. Hasil kajian ini sesuai dengan hasil penelitian Daud *et al* (2005) di Malaysia mengatakan bahwa bakteri yang mengalami beta hemolisis merupakan bakteri yang paling berpotensi untuk menghasilkan biosurfaktan. Pernyataan ini dikuatkan oleh penelitian Ni'matuzahroh (1999) yang memperoleh isolat bakteri *Pseudomonas* sp. dari kawasan perairan pantai Surabaya dengan kemampuan tipe hemolisis beta.

Untuk mengetahui secara pasti berapa besar kadar biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri ini perlu dilakukan kajian lebih lanjut dengan ekstraksi biosurfaktan.