

**USULAN PENELITIAN
TAHUN ANGGARAN 2020**

PENELITIAN INOVASI DAN PERCEPATAN HILIRISASI



**Karakteristik Biosurfaktan Bakteri Hidrokarbonoklastik Lokal di Area
Eksplorasi Chevron Petapahan Riau**

Tim Peneliti

Ketua : Dr. Irda Sayuti, M.Si
Anggota :
1. Prof. Dr. Bintal Amin, M.Sc
2. Dra. Darmawati, M.Si

**Sumber Dana : DIPA Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat Universitas
Riau 2020**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS RIAU
PEKANBARU
2020**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Karakterisasi Biosurfaktan Bakteri Hidrokarbonoklastik Lokal di Area Eksplorasi Petapahan, Riau.
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Dr. Irda Sayuti, M.Si
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIDN : 0010096303
 - d. Jabatan Struktural :
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 - f. Fakultas/ Jurusan : FKIP / Pendidikan Biologi
 - g. Alamat Kantor : Kampus Bina Widya Simpang Baru Panam
 - h. Telp/ Fax :
 - i. Alamat Rumah : Jalan Tengku Bey Perumahan Bumi Sejahtera B.13
 - j. Hp/ Tlp/ Fax/ Email : 081275727488
3. Anggota (1)
 - a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Bintal Amin, M.Sc
 - b. Jabatan Fungsional : Guru Besar
 - c. NIDN : 0003046302
4. Anggota (2)
 - a. Nama Lengkap : Dra. Darmawati, M.Si
 - b. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 - c. NIDN : 0003045302
5. Jangka Waktu Penelitian : Tahun ke 1 Dari rencana 2 tahun
6. Pembiayaan
 - a. Dana diajukan/ disetujui :
 - b. Sumber Dana : DIPA LPPM Universitas Riau 2020

Mengetahui:
Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu
Pendidikan

Prof.Dr. Mahdum, M.Pd
NIP:19601121987031004

Menyetujui:
Ketua LPPM Universitas Riau

Pekanbaru, 14 Maret 2020

Ketua Peneliti

Dr.Irda Sayuti, MSi
NIP: 196309101991032010

Prof. Dr. Almasdi Syahza, SE., MP
NIP. 196008221990021002

RINGKASAN RENCANA PENELITIAN

Salah satu pemanfaatan mikroorganisme dalam berbagai aspek kehidupan yakni dalam menghasilkan biosurfaktan. Dalam kehidupan, pertumbuhan dan pembiakan bakteri berinteraksi dan beradaptasi dengan lingkungannya dan dapat memberikan memberi efek positif maupun negative. Salah satu efek positif aktifitas mikroba dengan lingkungan adalah kemampuannya untuk memafaatkan sebagai peningkatan produksi minyak terutama melalui peningkatan perolehan minyak bumi secara mikrobiologi. Hal ini didasarkan pada kenyataan bahwa diantara mikroba itu ada yang mampu menghasilkan bahan kimia berupa biopolymer, biofilm, biosolvent, bioasam, biogas dan biosurfaktan yang dapat digunakan dalam proses bioremediasi (Banat et al., 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi bakteri – bakteri hidrokarbonoklastik yang dapat menghasilkan biosurfaktan dari area eksplorasi minyak PT Chevron Indonesia, wilayah Petapahan, Pekanbaru. Bakteri – bakteri yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi minyak bumi (Hidrokarbonoklastik) memiliki senyawa metabolit sekunder yang membantu mendegradasi minyak bumi. Salah satunya adalah senyawa biosurfaktan. Biosurfaktan adalah senyawa yang mampu mengubah minyak dari bentuk hidrofobik menjadi hidrofilik sehingga ketika minyak sudah menjadi soluble, baru mikroorganisme dapat mendegradasi minyak tersebut. Biosurfaktan memiliki kemampuan menurunkan tegangan permukaan dan tegangan antar molekul menggunakan mekanisme serupa seperti surfaktan berbahan kimia. Namun biosurfaktan lebih cocok diaplikasikan untuk lingkungan karena sifatnya yang biodegradability. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dan direncanakan akan dilakukan di laboratorium Biokimia Institut Teknologi Bandung (ITB).

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya oleh Sayuti (2019) yang telah mengisolasi bakteri hidrokarbonoklastik dari area eksplorasi PT Chevron, Petapahan, Riau. Hasil isolasi diperoleh 16 isolat bakteri yang selanjutnya disebut dengan Isolat Minyak Bumi (IMB) dengan kode IMB – 01 sampai IMB – 16 . Pada penelitian kali ini dilanjutkan dengan mengeksplorasi bakteri – bakteri yang dapat menghasilkan biosurfaktan. Rangkaian kegiatan ini meliputi skrining isolat lokal penghasil biosurfaktan menggunakan metode Drop Collapsing Test (Jain et al., 2015), selanjutnya isolat lokal dilanjutkan optimasi proses produksi yang meliputi pemilihan pH dan suhu yang cocok, pemberian konsentrasi minyak bumi sebagai sumber karbon

. Proses optimasi ini dilakukan secara bertahap yang dimana optimasi yang terbaik dilanjutkan pada pengujian selanjutnya. Parameter dari penelitian ini skrining Isolat Minyak Bumi dengan uji Total Petroleum Hydrokarbon (TPH), Pengukuran Chemical Oxygen Demand(COD), mengidentifikasi dan mendeteksi isolate minyak bumi berdasarkan amplikasi gen-gen yang spesifik seperti sequence gen 16 S r RNA. Kemudian dilanjutkan menganalisis metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Isolat minyak bumi tersebut berupa produksi senyawa biosurfaktan oleh Isolat Minyak Bumi tersebut, sehingga diperoleh nya senyawa biosurfaktan yang berasal dari isolat lokal yang memiliki aktivitas yang besar dalam mendegradasi minyak bumi. dengan cara ; menganalisis Aktivitas Produksi biosurfaktan oleh Bakteri Isolat Minyak Bumi.,Menguji kemampuan ekstrak biosupartan isolat Bakteri Minyak Bumi dalam mendegradasi Minyak bumi,Menentukan kondisi variasi pH dan suhu untuk menentukan kondisi karakteristik efektifitas dalam produksi biosurfaktan oleh Isolat Bakteri Minyak Bumi .

Hasil penelitian diharapkan dapat ditemukan isolat bakteri campuran dengan kandungan biosurfaktan terbaik sehingga dapat menjadi inovasi baru dalam teknologi bioremediasi limbah minyak bumi.

Kata kunci : Bakteri Hidrokarbonoklastik, Biosurfaktan, Minyak bumi.

DAFTAR ISI

Halaman Judul	1
Halaman Pengesahan	2
Ringkasan Rencana Penelitian	3
Daftar Isi	5
A. Latar Belakang	6
B. Rumusan Masalah	7
C. Maksud dan Tujuan Penelitian.....	7
D. Manfaat Penelitian.....	8
E. Tinjauan Pustaka	8
F. Metodologi Penelitian	12
G. Daftar Pustaka	21
H. Jadwal Kegiatan	22
I. Susunan Anggota Tim dan Pembagian Tugas Penelitian	22
J. Justifikasi Anggaran	23

A. LATAR BELAKANG

Kebutuhan akan energi khususnya minyak bumi dewasa ini semakin bertambah seiring dengan pertumbuhan penduduk dan pertambahan kebutuhan disektor rumah tangga, transportasi, listrik dan berbagai hal lain yang membutuhkan minyak bumi. Bertambahnya kebutuhan ini mengakibatkan perusahaan yang beroperasi pada sektor perminyakan terus mengoptimalkan produksinya. Akan tetapi produksi minyak bumi juga memiliki dampak yang merugikan bagi lingkungan berupa limbah minyak yang mencemari baik perairan maupun daratan.

Permasalahan pencemaran lingkungan akibat dari limbah minyak bumi dapat diatasi dengan teknologi bioremediasi yang memanfaatkan agen biologis untuk menguraikan senyawa minyak bumi hingga aman bagi lingkungan. Agen biologis yang umum digunakan adalah mikroorganisme bakteri. Biasanya bakteri yang digunakan adalah bakteri indigen yang dapat menguraikan rantai karbon minyak bumi. Penelitian Sayuti (2017) telah menemukan 16 isolat bakteri hidrokarbonoklastik dari Wash Tank Gathering station Chevron Pacific Indonesia wilayah Petapahan, Riau. Langkah selanjutnya isolate – isolate bakteri ini perlu diteliti lebih lanjut kemampuannya dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi sehingga nantinya bisa dimanfaatkan dalam pengolahan lingkungan tercemar minyak bumi.

Bakteri dapat mendegradasi minyak bumi ditunjang oleh senyawa biologis yang dihasilkannya yang disebut dengan biosurfaktan. Semua surfaktan termasuk biosurfaktan adalah kelompok struktur molekul beragam mempunyai 2 sifat yaitu hidrofob dan hidrofil. Bagian hidrofob (tidak suka air) mengandung molekul rantai panjang jenuh atau tidak jenuh dari asam lemak hidroksil, sedangkan hidrofil (suka air) seperti karbohidrat, asam amino atau peptida, anion dan kation polisakarida. Sifat biosurfaktan tersebut dapat diaplikasikan di lingkungan seperti bioremediasi minyak dari tanah dan air (Renga et al., 2018). Senyawa ini dikeluarkan oleh bakteri untuk menurunkan tegangan permukaan minyak bumi dengan air sehingga senyawa minyak bumi dapat diuraikan oleh bakteri. Saat ini, ketertarikan terhadap biosurfaktan (surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme) semakin meningkat karena biosurfaktan dapat digunakan dalam memacu biodegradasi minyak, serta mempunyai toksisitas rendah dan biodegradable (Matuzahroh., *et al* 2016).

Biosurfaktan yang dihasilkan tidak sama oleh setiap bakteri. Ada yang berupa rhamnolipid, glikolipid, lipoprotein dan glikoprotein (Goazan *et al.*, 2014). Begitu juga dengan biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Pseudomonas stutzerii* memiliki perbedaan dengan bakteri jenis lainnya. Perbedaan ini disebabkan oleh genetika dari masing – masing bakteri, jenis hidrokarbon, dan faktor lingkungan. Perbedaan jenis biosurfaktan yang dihasilkan menentukan tingkat kemampuan bakteri dalam mendegradasi minyak bumi.

Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti merasa perlu melakukan penelitian lebih lanjut terkait kemampuan isolat bakteri hidrokarbonoklastik tersebut dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder berupa biosurfaktan sebagai senyawa yang membantu dalam proses degradasi bakteri.

B. RUMUSAN MASALAH

Adapun Rumusan Masalah dalam Penelitian ini adalah

1. Bagaimana kemampuan 16 isolat minyak bumi mempunyai dalam mendegradasi minyak bumi ?
2. Bagaimanakah jenis-jenis bakteri isolat minyak bumi yang mampu mendegradasi minyak bumi menggunakan metode 16S rRNA?
3. Bagaimanakah pola Produksi biosurfaktan bakteri isolat minyak bumi?
4. Bagaimanakah Aktivitas Biosurfaktan dari Masing – Masing isolat minyak bumi?
5. Bagaimanakah kemampuan ekstrak biosupernatan isolat minyak bumi dalam degradasi minyak bumi ?
6. Bagaimanakah karakteristik terbaik dalam produksi ekstrak biosurfaktan oleh bakteri isolat minyak bumi?

C. MAKSUD DAN TUJUAN PENELITIAN

1. Menemukan isolate bakteri lokal yang dapat mendegradasi minyak bumi.
2. Mengidentifikasi isolat bakteri minyak bumi secara biomolekuler
3. Mengetahui pola produksi biosurfaktan oleh isolat bakteri minyak bumi meliputi kemampuan produksi surfaktan, jenis surfaktan, dan tingkat emulsifikasi
4. Menganalisis Aktivitas Produksi biosurfaktan oleh Bakteri Isolat Minyak Bumi.
5. Menguji kemampuan ekstrak biosupartan isolat Bakteri Minyak Bumi dalam mendegradasi Minyak bumi

6. Menemukan kondisi karakteristik efektif dalam produksi biosurfaktan oleh Isolat Bakteri Minyak Bumi

D. MANFAAT PENELITIAN

Adapun manfaat penelitian ini adalah diperolehnya isolat lokal hidrokarbon penghasil biosurfaktan, serta gugus biosurfaktan atau dispersan dan efektifitas biosurfaktan yang dihasilkan oleh Isolat Bakteri Minyak Bumi (IMB) yang merupakan bakteri hidrokarbon yang dapat meningkatkan degradasi Minyak bumi dan merupakan inovasi dalam teknologi bioremediasi limbah minyak bumi.

E. TINJAUAN PUSTAKA

1. Bakteri Hidrokarbonoklastik

Bioremediasi merupakan proses yang membutuhkan kemampuan mikroorganisme untuk mendegradasi limbah beracun, dan menjadi teknologi yang menjanjikan untuk pengolahan tanah beserta air yang terkontaminasi (Milic *et al.*, 2009). Menurut Bambang dan Sri (2013) menyebutkan bioremediasi merupakan salah satu metode alternatif pengolahan limbah minyak bumi yang digunakan untuk pemulihan tanah tercemar hidrokarbon. Bioremediasi mengandalkan reaksi mikrobiologis di dalam tanah. Teknik ini mengkondisikan mikroba sedemikian rupa sehingga mampu mengurai senyawa hidrokarbon yang berada di dalam tanah. Limbah minyak bumi yang diuraikan oleh mikroba akan menghasilkan senyawa akhir yang lebih ramah lingkungan (Bambang dan Sri, 2013).

Bakteri yang dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon pada umumnya memiliki plasmid degradatif, yaitu plasmid yang mengkode gen untuk membentuk sistem enzim yang dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon. Banyak bakteri tanah, seperti *Pseudomonas* sp. memiliki plasmid degradatif salah satu contoh plasmid degradatif adalah plasmid toluen (TOL) yang mengkode sistem enzim untuk mendegradasi toluen (Sugiman, 2013).

Bakteri pendegradasi hidrokarbon memutuskan ikatan karbon yang terdapat dalam senyawa hidrokarbon yang seringkali menjadi struktur lain yang ramah lingkungan. Pendegradasi senyawa hidrokarbon oleh bakteri dapat dilakukan dengan dua cara, cara pertama ialah dengan biodegradasi sempurna atau mineralisasi dan cara

kedua dengan biodegradasi tidak sempurna (kometabolisme). Mineralisasi meliputi oksidasi dari senyawa hidrokarbon menjadi karbondioksida dan air yang dapat digunakan untuk pertumbuhan dan reproduksi sel. masing-masing tahapan dalam proses degradasi dikatalisis oleh enzim spesifik yang disintesis oleh sel (Karwati,2009).

Satu bakteri hanya dapat mendegradasi senyawa jenis tertentu yang ada pada minyak bumi, tetapi populasi campuran atau komunitas bakteri dapat meningkatkan level degradasi, dikarenakan beberapa substrat hanya dapat didekomposisikan melalui kometabolisme. Kometabolisme adalah peristiwa transformasi senyawa hidrokarbon oleh mikroorganisme. Kometabolisme merupakan degradasi tidak sempurna. Berbeda dengan mineralisasi, pada kometabolisme mikroorganisme tidak dapat menggunakan hasil transformasi sebagai sumber karbon atau sumber energi untuk mendukung pertumbuhan (Hajar, 2012).

2. Biosurfaktan

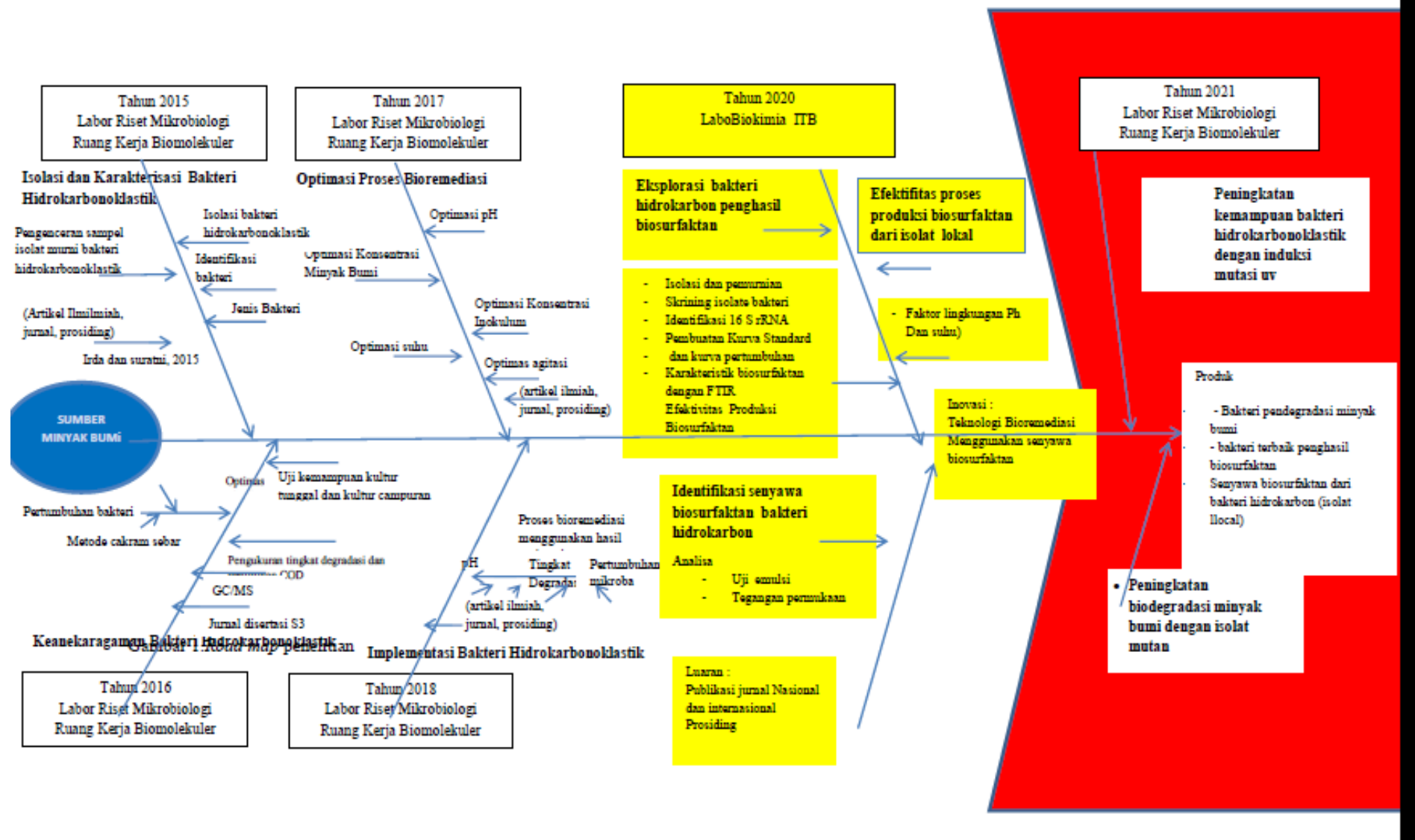
Biosurfaktan merupakan salah satu sumber energi alternatif yang disintesis secara ekstraseluler oleh mikroba dengan aktivitas sebagai penurun tegangan permukaan. Berdasarkan struktur, molekul surfaktan mengandung gugus hidrofilik dan hidrofobik yaitu suatu sifat yang mampu mengkonsentrasikan molekul-molekul interpermukaan yang berbeda derajat polaritasnya, seperti inter permukaan minyak dalam air. Biosurfaktan dapat dihasilkan oleh mikroorganisme prokariot seperti *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, dan *Lactobacillus*. Surfaktan sintesis kimiawi biasanya diklasifikasikan menurut sifat gugus polarnya, sedangkan surfaktan mikrobial dibedakan berdasarkan sifat struktur kimiawi dan juga spesies mikroba penghasil. Perbedaan sifat-sifat fisis dan kimia molekul biosurfaktan merupakan hal yang mendasar dan penting diketahui guna menentukan potensi aplikasi dari biosurfaktan dan kegunaan potensial senyawa biosurfaktan tersebut (Sari *et al.* 2015).

Menurut Sarbini (2012) surfaktan dapat diaplikasikan pada berbagai jenis industri seperti produksi deterjen, emulsifier, cat, tinta, untuk formulasi herbisida dan insektisida dalam bidang agrokimia. Dalam bidang 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 sintesis dalam penanganan limbah cair memiliki beberapa kekurangan seperti harga yang mahal, tidak mudah didegradasi dan beberapa bersifat toksik sehingga dapat menyebabkan terjadinya pencemaran lingkungan dan mempengaruhi organisme yang hidup di dalam lingkungan tersebut. Untuk mencegah kerusakan lingkungan akibat surfaktan sintesis, maka diperlukan beberapa cara agar komposisi padatan organik yang tersuspensi jumlahnya dapat dikurangi, salah satunya adalah penggunaan biosurfaktan atau surfaktan yang dihasilkan oleh organisme hidup (Riupassa et al. 2013).

Biosurfaktan sebagian besar diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, ragi (khamir) dan kapang secara biotransformasi sel. Beberapa mikroba dapat menghasilkan surfaktan pada saat tumbuh pada berbagai substrat yang berbeda, mulai dari karbohidrat sampai hidrokarbon. Perubahan substrat seringkali mengubah juga struktur kimia dari produk sehingga akan mengubah sifat surfaktan yang dihasilkan. Beberapa mikroorganisme juga ada yang menghasilkan enzim dan dapat digunakan sebagai katalis pada proses hidrolisis, alkoholisis, kondensasi, asilasi atau esterifikasi (Lin Soo et al., 2003).

Pengelompokan biosurfaktan terutama didasarkan pada komposisi kimia dan mikroba penghasilnya. Secara umum, gugus hidrofilik terdiri atas asam amino atau peptida dan gugus hidrofobik mengandung lemak jenuh, tak jenuh atau asam lemak. Kelompok utama biosurfaktan terdiri atas glikolipid, lipopeptida dan lipoprotein, fosfolipid dan asam lemak, surfaktan polimer, dan surfaktan partikulat. Rhamnolipid, biosurfaktan dari kelompok glikolipid merupakan jenis yang paling banyak dipelajari dan dikarakterisasi. Glikolipid mengandung karbohidrat seperti sorbitosa, trehalosa atau rhamnosa yang tergabung ke asam alifatik rantai panjang atau lipopeptida (Singh 2012). Mikroba menghasilkan biosurfaktan yang bervariasi. Ron dan Rosenberg (2001) mengklasifikasikan biosurfaktan menjadi dua, yaitu biosurfaktan dengan berat molekul besar dan berat molekul kecil.



Gambar 1. Road Map Penelitian

F. METODOLOGI PENELITIAN

1. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Desember 2019 di Laboratorium Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung

2. Bahan dan Alat

2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat gelas dan alat listrik. Alat gelas yang digunakan adalah Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, batang L (*Glass Spreader*), batang ose, gelas ukur, thermometer, gelas kimia dan *sand-pack column*. Alat listrik yang digunakan mencakup *rotary shaker* incubator, vortex, inkubator, autoklaf, *refrigerated centrifuge*, mikroskop cahaya, lemari pendingin, penangas (*heater*), *Laminar Air Flow*, dan pH meter. Alat-alat lain yang digunakan adalah mikropipet ukuran 10-200 μ l dan 1001000 μ l, serta alat habis pakai berupa tabung falcon berukuran 15 ml dan 50 ml, kertas Whatmann No. 2, *bluetips*, dan *yellowtips*.

2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas media aktivasi dan media produksi biosurfaktan. Media aktivasi bakteri secara umum menggunakan *Nutrient broth* (NB) dan *Nutrient Agar* (NA) dengan penambahan 1% (v/v) *crude oil*. Media produksi biosurfaktan, berupa medium *Salt Mineral Stone Solution* (SMSS) yang terdiri dari (per liter akuades) (Gudina dkk., 2011): NH_4NO_3 (2,5 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g); CaCO_3 (0,5 g); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g); KH_2PO_4 (0,5 g) dengan modifikasi penambahan 0,1 % (w/v) ekstrak ragi, *trace element* (per 100 ml akuades): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g), Na_2MoO_4 (0,006 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g) dan sumber karbon. Sumber karbon yang digunakan untuk produksi biosurfaktan pada penelitian ini berupa glukosa *light oil* (2%).

2.3 Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 Isolat bakteri Hidrokarbonoklastik yang diisolasi dari *Wash Tank Gathering Station* Petapahan PT Chevron Riau (Sayuti, 2018). Isolat tersebut adalah *Bacillus Toyonensis strain MG675633*,

2.4 Sampel Minyak

Sampel minyak mentah ringan (*light oil*) yang digunakan pada penelitian ini diambil dari reservoir Petapahan, Riau. *Light oil* digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri, melakukan pengukuran aktivitas indeks emulsifikasi dan *Oil Test Spread*.

3. Jenis Dan Sumber Data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer bersumber dari eksperimen yang akan dilakukan dalam penelitian.

4. Teknik Pengmpulan Data

Pengumpulan data dilakukan melalui berbagai tahapan penelitian sebagai berikut:

4.1 Skrining Bakteri Hidrokarbonoklastik

Semua isolat yang berhasil diisolasi dan telah murni/ koloni tunggal diuji kemampuan dalam mendegradasi minyak bumi. Hal ini dimaksudkan untuk menyeleksi isolat yang memiliki potensi yang cukup tinggi dalam mendegradasi minyak bumi. Masing-masing isolat yang telah diperoleh, ditumbuhkan dalam medium cair SMSS + 10% minyak bumi dan *dishaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan *rotary shaker incubator* pada 28 °C selama 7 hari. Isolat yang memiliki kemampuan degradasi tinggi dapat dilihat larutnya ke dalam medium atau terbentuknya misel (Zam, 2006).

4.2 Identifikasi Bakteri Hidrokarbonoklastik

4.2.1 Isolasi DNA Genom menggunakan Kit Invitrogen

Seluruh isolat bakteri yang memiliki kemampuan terbaik dalam mendegradasi minyak bumi diidentifikasi dengan molekuler yakni menggunakan 16S rRNA (Gambar 3.2). Metode tersebut dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat terbaik didalam media cair Nutrient Broth (NB) selama 16 jam pada suhu 28 °C dengan agitasi 120 rpm menggunakan *rotatory shaker*. DNA diekstraksi dengan menggunakan Kit *Wizard genom DNA purification* (Invitrogen) mengikuti instruksi produsen sebagai berikut:

Tahapan pertama digesti: 1 ml suspensi bakteri dimasukkan kedalam *microtube* 1,5 ml lalu disentrifus suspensi bakteri dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Tambahkan lizozim digesti buffer sebanyak 180 µl di vortex, inkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya tambahkan 20 µl proteinase K, divortex lalu tambahkan 200 µl genomic lisis binding buffer lalu divortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 55 °C, selanjutnya ditambahkan etanol absolut sebanyak 200 µl dan divortex.

Tahapan kedua binding: dimasukkan spinkulum kedalam tabung, tuangkan cairan dari binding proses kedalam spinkulum dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit, buang *collection tube*, ganti dengan yang baru.

Tahapan ketiga washing: tambahkan 500 µl wash buffer I, disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit, buang *collection tube*, dan diganti dengan yang baru. Tambahkan 500 µl wash buffer 2, disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit, selanjutnya diambil spinkulum, masukkan ke *microtube* 1,5 ml steril.

Tahapan keempat elusi: tambahkan 200 µl genomic elusion buffer, biarkan selama 1 menit disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit, buang spinkulum selanjutnya dielektroforesis dengan gel agarosa 1,5 % dan dilihat di sinar UV.

4.2.2 Amplifikasi DNA genom dengan Primer 16S Rrna

Amplifikasi DNA genom menggunakan Kit dari Promega, tahapan-tahapan yang dilakukan sesuai dengan petunjuk protokol dari produsen kit tersebut. DNA yang telah diekstraksi dikeringkan dalam *Vacufuge* (Eppendorf, Westbury, NY) selama 15 menit dan kemudian dilarutkan dalam 100 µl dari larutan *DNA rehydration* (Promega). Amplifikasi gen 16S Rrna dilakukan dalam 50 µl dari campuran reaksi yang mengandung 10 pmol primer 63f (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') dan 1387r (5'-GG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991), 25 µl green tag Promega, DNA templat 3 µl (10ng/µl), volume dicukupkan dengan penambahan nuclease free water 20 µl.

Amplifikasi PCR dilakukan dalam 35 siklus yang diawali dengan denaturasi awal di suhu 94 °C selama 3, kemudian dilanjutkan dengan tahapan denaturasi 94 °C selama 1 menit. *Anealing* berlangsung pada suhu 55 °C selama 30 detik, *extension* selama 30 detik pada suhu 72 °C dan berakhir pada *extension* akhir pada suhu 72 °C selama 5 detik. Siklus PCR berlangsung sebanyak 35 siklus selama 3 jam.

4.2.3 Visualisasi Produk PCR Menggunakan Elektroforesis

7 µl hasil PCR diperiksa dengan gel elektroforesis. Visualisasi hasil PCR dilakukan elektroforesis pada agarose 1,5% yakni dengan menimbang agarose sebanyak 0,75 gr dan dilarutkan dalam 50 ml TBE (Tris Boric EDTA) selanjutnya dipanaskan dengan *hoteplate*. Sisa produk PCR dibersihkan menggunakan *Wisaya SV Gel* dan *DNA purification system* (Invitrogen) dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer Nano Drop dan dikirim ke singapura untuk proses *sequencing*.

4.2.4 Analisis Bioinformatika Hasil Sequencing Dari Isolat Bakteri

Urutan diperiksa dan diedit dengan menggunakan *Bioedit Sequence Alignment Editor* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Analisis kesamaan dilakukan dengan menggunakan *Basic Local Alignment Tool* pada National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analisis evolusi dilakukan dengan menggunakan MEGA6 (Tamura *et al.*, 2011).

4.3. Pola Produksi Biosurfaktan Bakteri Hidrokarbonoklastik

4.3.1 Pembuatan Pre Kultur Bakteri

Sebanyak tiga ose isolat dari slant agar diinokulasi ke dalam erlenmeyer ukuran 250 ml yang berisi 80 ml medium SMSS ditambah minyak bumi 2% (sebagai sumber karbon), kemudian diinkubasi dalam *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengukuran kekeruhan dari kultur dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 600nm. Inokulum prekultur digunakan sebagai inokulum untuk pembuatan kultur kurva pertumbuhan dan optimasi produksi biosurfaktan

4.3.2 Pembuatan Kurva Produksi Biosurfaktan masing – masing isolat bakteri

Inokulum dibuat dalam erlenmeyer 250 ml berisi 80 ml medium SMSS dan minyak bumi 2%, ditambahkan 5% (v/v) inokulum yang berasal dari prekultur, kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* dengan agitasi 120 rpm pada suhu ruang. Pada jam ke-0 dan tiap 24 jam berikutnya dilakukan pengukuran kekeruhan dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 600nm dan indeks emulsi (IE₂₄%) sebagai uji aktifitas emulsifikasi biosurfaktan.

4.3.3 Uji Aktivitas Emulsifikasi

Uji aktifitas emulsifikasi dilakukan dengan cara : Sebanyak 20 ml kultur bakteri pada tahap 4.1.2 disentrifugasi dengan agitasi 7500 rpm selama 30 menit pada suhu 4⁰C dengan tujuan untuk melisiskan sel. Hasil dari sentrifug berupa supernatan. Supernatan yang didapat selanjutnya diambil sebanyak 10 ml ditambahkan dengan 3 ml hidrokarbon uji (minyak bumi) dan divortex dengan kecepatan maksimum selama 2 menit. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 24 jam yang selanjutnya diukur dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\%E_{24} = \frac{\text{tinggi lapisan emulsi}}{\text{total tinggi}} \times 100\%$$

4.3.4 Ekstraksi Biosurfaktan

Ekstraksi biosurfaktan dilakukan terhadap kultur dengan nilai IE₂₄% terbaik. Dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut kloroform:methanol. Hal ini dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya (Maneerat & Phetrong, 2007).

Tiga puluh ml kultur (4.1.2) disentrifugasi (7500 rpm selama 30 menit pada suhu 4⁰C) dengan tujuan untuk melisis sel. Supernatan yang didapat kemudian diasamkan dengan HCl sampai pH 2. Selanjutnya didiamkan satu malam pada suhu 40⁰C. Setelah itu, supernatan diekstraksi dengan kloroform:methanol (2:1) selama 10 menit dan dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator. Pelet yang diperoleh dari hasil ekstraksi berwarna kekuning – kuning kemudian dikeringkan pada suhu 60⁰C, selanjutnya ditimbang sampai diperoleh berat konstan. Berat ekstrak tersebut merupakan crude biosurfaktan.

4.4 Mengetahui Aktivitas Biosurfaktan dari masing – masing isolat bakteri

4.4.1 Pengukuran Tegangan Permukaan (*Interfasial Tension* (IFT)

IFT antara sampel supernatant dengan *light oil* diukur menggunakan dua alat dengan metode yang berbeda. Alat pengukuran IFT yang digunakan berupa Drop Master DMS401 untuk metode *pendant drop* (PD) dan Tensiometer Du Nouy untuk metode *du Nuoy ring*. Metode *pendant drop* digunakan untuk mengukur nilai IFT pada tahapan seleksi sumber karbon untuk produksi biosurfaktan dan uji karakter biosurfaktan dari sumber karbon terpilih. Metode *du Nuoy ring* digunakan untuk mengukur nilai IFT pada tahapan pembuatan kurva tumbuh dan pola produksi biosurfaktan serta penentuan nilai CMC (*critical micelle concentration*) biosurfaktan.

4.4.2 Oil Spreading Test

Tahapan ini dilakukan dengan menggunakan *light oil* dan *heavy oil*. Pengukuran OST menggunakan *light oil* dilakukan dengan meneteskan lapisan tipis *light oil* sebanyak 20 µl di atas cawan petri yang berisi 50 ml akuades. Sebanyak 10 µl supernatant kultur bakteri ditetaskan di tengah lapisan minyak. Parameter adanya

aktivitas biosurfaktan pada supernatant ditunjukkan oleh pergerakan minyak yang menyebar dan membentuk zona bening di dalam area lapisan minyak. Aktivitas biosurfaktan ditentukan melalui pengukuran diameter zona bening yang terbentuk (Satpute dkk., 2010). Pada pengukuran OST menggunakan *heavy oil* dilakukan dengan mencampurkan 1 ml *heavy oil* dan 1 ml supernatan ke dalam tabung reaksi dan divortek hingga homogen. Selanjutnya, hasil campuran minyak dan supernatan diteteskan di atas *cover glass* yang diletakkan secara vertikal. Panjang tetesan campuran, yang terbentuk di atas gelas benda, diukur sebagai parameter aktivitas biosurfaktan (Roldan-Carillo dkk., 2011).

4.4.3 Karakterisasi Ekstrak Biosurfaktan Menggunakan FTIR

Karakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus toyonensis strain IMB-10* menggunakan medium SMSS dengan sumber karbon terpilih dilakukan melalui analisis Fourier Transform Spectrophotometer Infrared (FTIR). Prosedur pengukuran IFT disesuaikan dengan standar operasional penggunaan alat yang telah dibuat oleh Laboratorium Kimia Analitik, Fakultas MIPA, ITB. Ekstrak kering biosurfaktan dari tahapan ekstraksi biosurfaktan dikarakterisasi kandungan gugus fungsional penyusun molekulnya melalui metode scanning pada bilangan gelombang (wavenumber) spektrum infra merah 400-4000 cm⁻¹. Persiapan sampel dilakukan dengan menggerus ekstrak biosurfaktan dan senyawa KBr hingga homogen. Campuran dituang pada cetakan (KBr Die) dan diberikan tekanan 10x1.000 kg untuk membentuk pelet. Produk pelet yang dihasilkan selanjutnya dideteksi kandungan gugus fungsionalnya menggunakan alat FTIR. Output hasil pembacaan yang dihasilkan adalah % transmittan (T) pada range spektrum infra merah yang digunakan (Das dan Mukherjee, 2007 dan Zhao dkk., 2015).

4.4 Mengetahui Kemampuan Isolat Bakteri dalam Mendegradasi Minyak Bumi

Cara ini dilakukan dengan menumbuhkan ketiga isolat bakteri pada media SMSS + 2% minyak bumi dan media SMSS+ 2% minyak bumi tanpa perlakuan penumbuhan isolat bakteri sebagai pembanding (kontrol). Masing – masing sampel di analisis dengan GC – MS untuk melihat degradasi unsur carbon yang terjadi.

4.6 Efektivitas Produksi Biosurfaktan

Tahapan ini bertujuan untuk meningkatkan produksi biosurfaktan dari masing – masing isolat bakteri dengan perlakuan keadaan lingkungan yang berbeda (pH, suhu).

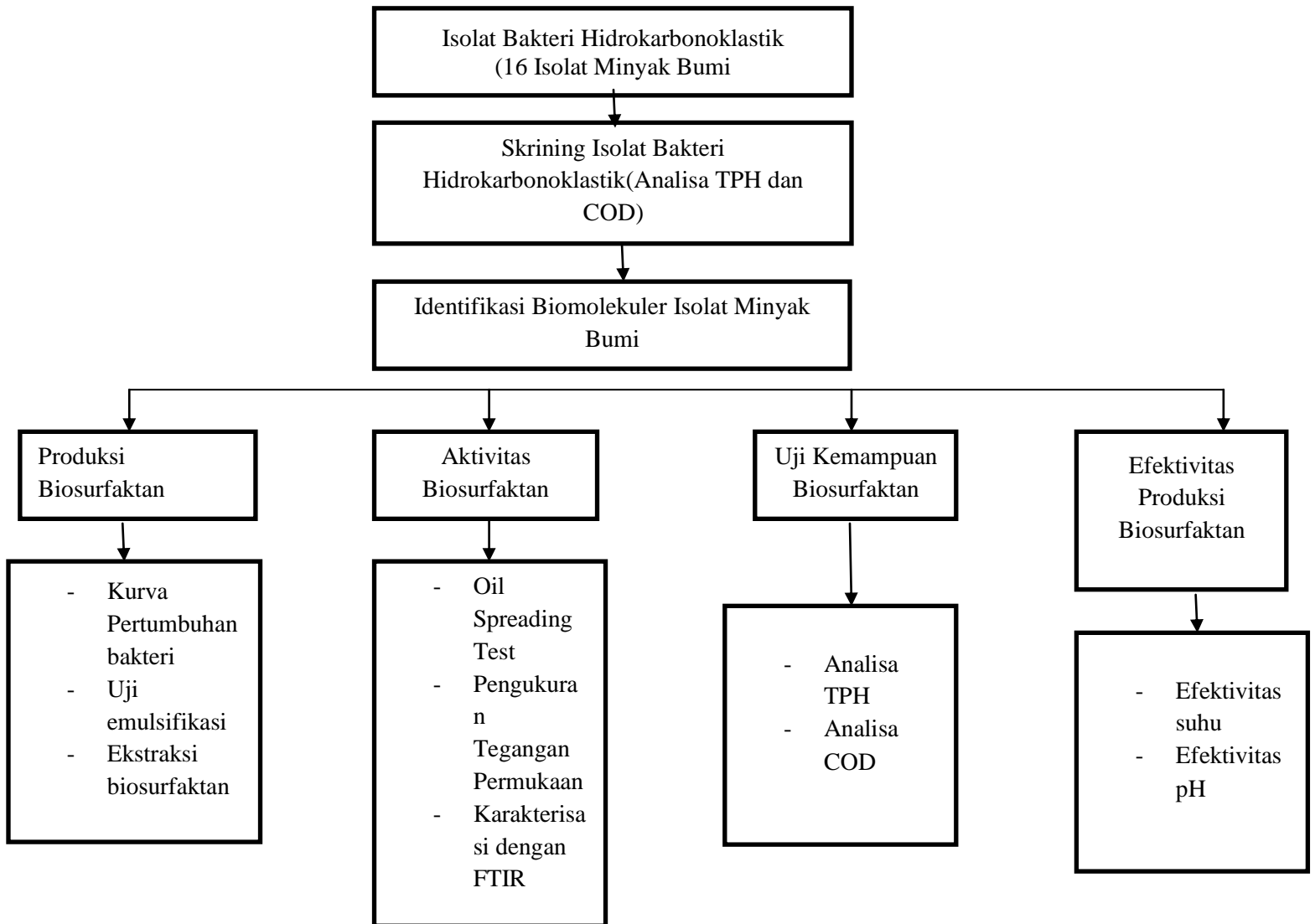
4.6.1 Variasi pH

Variasi pH yang digunakan adalah 2, 7 dan 9. pH diatur pada media tumbuh bakteri dengan penambahan HCl. Pada masing – masing sampel kemudian dilakukan uji emulsifikasi sesuai tahap sebelumnya untuk melihat perlakuan yang memberi indeks emulsifikasi tertinggi.

4.6.2 Variasi Suhu

Variasi pH yang digunakan adalah 31⁰c, 34⁰C, 37⁰C dan 40⁰C. Pada masing – masing sampel kemudian dilakukan uji emulsifikasi sesuai tahap sebelumnya untuk melihat perlakuan yang memberi indeks emulsifikasi tertinggi.

SISTEMATIKA PENELITIAN



G. DAFTAR PUSTAKA

- Gozan Misri , Izzah Nur Fatimaha , Cut Nandab , dan Abdul Harisb. 2015. Produksi Biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan Substrat Limbah Biodiesel Terozonasi untuk Peningkatan Perolehan Minyak Bumi. *Journal Argo Based Industries*. 2 (12) p. 38 – 44
- Ni'matuzahroh, Arif Yachya, dan Mulyadi Tanjung. 2016. Studi Perbandingan Biosurfaktan *Pseudomonas Aeruginosa* Ia7d Dan Surfaktan Sintetik Tween-80 Dalam Biodegradasi Solar Oleh Mikroba Perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. *Jurnal Panel Hayati*. 12 (13 – 18)
- Pereira JFB, Gudina EJ, Costa R, Vitorino R, Teixeira JA, Coutinho JAP et al. 2015. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*. 111: 259–268.
- Rizky Pachria. 2016. Karakterisasi Gugus Fungsi Dan Aplikasi Biosurfaktan *Bacillus Subtilis* Atcc 19659 Dengan Media Limbah Tahu. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor
- Sari M, Afiati F, Sharyoto, W, 2015. Potensi Bakteri Lumpur Minyak Sebagai Penghasil Biosurfaktan dan Antimikroba. *Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Teknologi*. 1(1): 85-88.
- Sayuti, Irda. 2018. Diversity of Hydrocarbonoclastic Bacteria from Waste Tank of Chevron Exploration Area in Petapahan, Riau. *Journal Of Pure And Applied Microbiology*. 12 (8).
- Sousa M, Dantas IT, Feitosa FX, Alencar AEV, Soares SA, Melo VMM. Gonçalves, Sant'ana HB. 2015. Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAM1005 on the formation of oil/biosurfactant/water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazil J Chem Engineer*. 31(3): 613-623.
- Waghmode S, Kulkarni C, Shukla S, Sursawant P, Velhal C. 2015. Low cost production of biosurfactant from different substrates and their comparative study with commercially available chemical surfactant. *Inter J Sci Tech Res*. 3(3): 146- 149
- Winajarko A, Yuliani H, Hermansyah H, Sahlan M. 2018. Isolation and properties characterization of biosurfactant synthesized by pyrene degrading *Bacillus subtilis* C19. *J Chem Chem Eng*. 6: 889 – 896

H. JADWAL KEGIATAN

Kegiatan	Bulan							VIII
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Peremajaan stok isolate lokal								
Skrining isolate penghasil biosurfaktan								
Identifikasi Biomolekuler								
Produksi Biosurfaktan								
Aktivitas Biosurfaktan								
Uji Kemampuan Biosurfaktan								
Efektivitas Produksi Biosurfaktan								
Pengolahan data dan analisa data serta pembuatan pelaporan								

I. SUSUNAN ORGANISASI DAN PEMBAGIAN TUGAS TIM PENELITIAN

Nama	Jabatan	Kegiatan
Prof. Dr. Yusni Ikhwan Siregar, M.Sc	Ketua	Penyusun proposal, analisis,
Dr. Irda Sayuti, M.Si	Anggota (1)	Survey lapangan, pengambilan sampel, pelaksanaan kerja laboratorium.

J. JUSTIFIKASI BIAYA PENELITIAN

Biaya barang habis pakai (Media Pertumbuhan Bakteri Lokal Hidrokarbonoklastik)

No.	Uraian	Vol	Satuan	Harga Kemasan (Rp)	Jumlah Harga (Rp)
1	Nutrient Agar (Merck) 500 g	4	Botol	1.272.000	5.088.000
3	CaCO ₃ (Merck) 500 g	2	Botol	732.000	1.464.000
4	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (Merck) 500 g	2	Botol	658.000	1.316.000
5	KH ₂ PO ₄ (Merck) 250 g	4	Botol	234.000	936.000
6	MnCl ₂ .4H ₂ O (Merck) 100 g	10	Botol	200.000	2.000.000
7	NH ₄ NO ₃ (Sigma) 500 g	2	Botol	543.000	1.086.000
8	NaOH (Merck) 500 g	2	Botol	378.000	756.000
9	NaCl (Merck) 500 g	2	Botol	541.000	1.082.000
11	Agar (Difco) 500 g	1	Botol	800.000	1.950.000
12	Alkohol 96%	30	Liter	30.000	900.000
13	Spirtus	20	Liter	25.000	250.000
14	Kapas Lemak 1.000 g	1	Buah	35.000	35.000
15	Tissue	10	Buah	5.000	50.000
16	Aluminium Foil	15	Buah	24.000	76.000
17	Benzena (Merck) 2,5 L	1	Botol	1.250.000	1.250.000
18	Pentana (Merck) 2,5 L	1	Botol	1.500.000	1.500.000
19	Dietileter (Merck) 2,5 L	1	Botol	1.090.000	1.090.000
	Total Biaya				21.513.000

Honorarium

No.	Uraian	Jumlah	Harga satuan	Jumlah Biaya (Rp)
1	Honor Analis	3	-	7.000.000
2	Honor Petugas Administrasi	1	2.000.000	2.000.000
Total				9.000.000

Biaya Perjalanan Penelitian

No.	Uraian	Vol	Satuan	Harga Satuan(Rp)	Jumlah Harga (Rp)
1	Rental Mobil	5	Hari	350.000	1.750.000
2	Pembelian Bahan Bakar	80	Liter	7.300	582.000
3	Konsumsi	24	Kali	20.000	480.000
4	Penginapan	10	Kali	750.000	7.500.000
5	Survei pendahuluan	1	Kali	1.500.000	1.500.000
Total					11.812.000

Belanja barang Non Operasional

No.	Uraian	Jumlah sampel	Harga satuan	Jumlah Biaya (Rp)
1	Skrining Bakteri	16	800.000	12.800.000
	TPH			
	COD	16	300.000	4.800.000
2	Analisa PCR dan Sequences DNA	16	600.000	9.600.000
2	Analisa FITR	1	300.000	300.000
Total				27.500.000

Biaya Keseluruhan

No.	Uraian	Jumlah Biaya (Rp)
1	Honorarium	9.000.000
2	Bahan Habis Pakai	21.513.000
3	Biaya Perjalanan Penelitian	11.812.000
4.	Belanja Barang Non Operasional	27.500.000
Total		69.827.000

