

**ISOLASI, SELEKSI, DAN KARAKTERISASI BAKTERI
PENGHASIL BIOSURFAKTAN DARI LOKASI TERCEMAR
HIDROKARBON DI KAWASAN TELUK JAKARTA**

SKRIPSI

**Disusun untuk Melengkapi Syarat-Syarat
Guna Memperoleh Gelar Sarjana Sains**



**NURLAILA KHAIRUNNISA
3425101474**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

2015

ABSTRAK

NURLAILA KHAIRUNNISA. **Isolasi, Seleksi, dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Lokasi Tercemar Hidrokarbon di Kawasan Teluk Jakarta.** Skripsi. Jakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Jakarta. 2015.

Limbah minyak bumi menimbulkan dampak buruk bagi lingkungan dan organisme hidup karena bersifat toksik. Minyak bumi terdiri dari alkana, sikloalkana, aromatik, poliaromatik (PAH), dan senyawa hidrokarbon lainnya yang memiliki kelarutan rendah dalam air sehingga sulit didegradasi. Biosurfaktan merupakan senyawa penurun tegangan permukaan (surfaktan) yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Senyawa ini berperan dalam meningkatkan kelarutan hidrokarbon sehingga mempercepat proses biodegradasi. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri penghasil biosurfaktan dari lokasi tercemar hidrokarbon di kawasan Teluk Jakarta. Sampel diambil dari tanah yang tercemar di tepi sungai dan pelabuhan kapal nelayan di daerah Cilincing yang bermuara ke Teluk Jakarta. Kultur pengayaan dilakukan dalam *mineral salt medium* (MSM) yang ditambahkan dengan dua sumber karbon berbeda, yaitu minyak mentah dan oli bekas. Isolasi dilakukan dengan metode cawan tuang. Sebanyak 64 isolat bakteri yang didapat pada tahap isolasi kemudian diuji kemampuannya dalam menghasilkan biosurfaktan dengan metode *blood haemolysis test*, *drop collapsing test*, dan *oil displacement test*. Isolat yang positif menghasilkan biosurfaktan kemudian dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel, tipe Gram, dan kemampuan mendegradasi naftalena. Berdasarkan hasil pengujian, didapatkan 23 isolat bakteri (lokasi I = 9; lokasi II = 14) yang menghasilkan biosurfaktan. Satu di antaranya adalah bakteri Gram positif, dan 22 lainnya adalah bakteri Gram negatif. Di antara bakteri penghasil biosurfaktan yang didapat, 4 isolat memiliki kemampuan mendegradasi naftalena, yaitu isolat 1Acu-3, 1Bcu-13, 2Bcu-24, dan 2Bcu-27.

Kata kunci: isolasi, seleksi, biosurfaktan, bakteri, hidrokarbon, Teluk Jakarta, naftalena.

ABSTRACT

NURLAILA KHAIRUNNISA. Isolation, Selection, and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Site in The Gulf of Jakarta. Thesis. Jakarta: Faculty of Mathematic and Natural Science. State University of Jakarta. 2015.

Petroleum waste giving negative impacts to the environment and living organisms due to its toxicity. Petroleum is composed of alkanes, cycloalkanes, aromatic, polyaromatic (PAH), and other hydrocarbon compounds that have low solubility in water which causing the compounds are difficult to degrade. Biosurfactants are surface tension-lowering compounds (surfactant) produced by microorganisms. These compounds play a role in increasing the solubility of hydrocarbon thus accelerating the process of biodegradation. This study aims to obtain biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon contaminated sites in the Gulf of Jakarta. Samples were taken from contaminated soil on the banks of a river and a fishing boats harbor in Cilincing which empties into the Gulf of Jakarta. Enrichment culture was performed in mineral salt medium (MSM) supplemented with two different carbon sources: crude oil and used oil. Bacteria isolation was performed with pour plate method. A total of 64 bacterial isolates which were obtained from isolation stage then tested for their ability to produce biosurfactant by blood haemolysis test, drop collapsing test, and oil displacement test. Positive isolates obtained then characterized based on colony and cell morphology, Gram types, and the ability to degrade naphthalene. Based on the test results, 23 bacterial isolates (location I = 9; location II = 14) are able to produce biosurfactant. One of them is a Gram-positive bacteria, and 22 others are Gram-negative bacteria. Among the biosurfactant-producing bacteria which were obtained, 4 isolates are capable to degrade naphthalene (1Acu-3, 1Bcu-13, 2Bcu-24, and 2Bcu-27).

Key words: isolation, selection, biosurfactant, bacteria, hydrocarbon, Gulf of Jakarta, naphthalene.

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi yang berjudul: **“Isolasi, Seleksi, dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Lokasi Tercemar Hidrokarbon di Kawasan Teluk Jakarta”**.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis mendapat bimbingan, dukungan, bantuan, dan doa dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra. Tri Handayani Kurniati, M.Si. selaku dosen pembimbing I dan Ibu Dra. Muzajjanah, M.Kes. selaku dosen pembimbing II, yang selalu berbaik hati memberikan arahan, bimbingan, motivasi, dan bantuan hingga terselesaiannya skripsi ini.
2. Ibu Dra. Yoswita Rustam, M.Si. selaku dosen penguji I dan Ibu Dr. Dalia Sukmawati, S.Pd., M.Si. selaku dosen penguji II atas segala saran, kritik, dan masukan dalam penyempurnaan perbaikan skripsi ini.
3. Ibu Dra. Nurmasari Sartono, M.Biomed. selaku pembimbing akademik yang selalu memberikan doa dan motivasi kepada penulis.
4. Bapak Drs. M. Nurdin Matondang S., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Negeri Jakarta.
5. Ibu Eka Putri Azrai, S.Pd., M.Si. selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Negeri Jakarta.

6. Papa, Mama, dan kedua kakak tercinta yang senantiasa memotivasi, mendoakan, serta memberi dukungan moril dan materil kepada penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
7. Rekan kerja di laboratorium, Intan dan Irfan, serta sahabat-sahabat seperjuangan di Biologi 2010: Heni, Aulia, Tiwi, Indah, Pidi, Nadia, Dhany, Syifa, Puspita, Monik, Fitri, Echa, Masda, Wiena, Nurliya, Intan P., Ardi, Juliadi, Andes, Faisal untuk semua dukungan, doa, bantuan, semangat, serta kebersamaan selama 4 tahun ini.
8. Mei, Neni, Saida, Hilma, Uni untuk semua kebersamaan, dukungan, dan bantuan selama penelitian.
9. Bu Desi, Pak Isnin, dan Pak Ato yang senantiasa memberi bantuan di laboratorium.
10. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Karena itu penulis mengharapkan segala kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan skripsi ini.

Jakarta, Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5

BAB II KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERPIKIR

A. Kajian Pustaka	6
1. Senyawa Aktif Permukaan atau Surfaktan	6
2. Biosurfaktan	7
a. Klasifikasi Biosurfaktan	7
b. Mekanisme Kerja Biosurfaktan	8
c. Peran Biosurfaktan	11
d. Mikroorganisme Penghasil Biosurfaktan	12
3. Metode Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan	14
a. <i>Blood Haemolysis Test</i>	14
b. <i>Drop Collapsing Test</i>	15
c. <i>Oil Displacement Test</i>	15
4. Biosurfaktan dan Degradasi Hidrokarbon	16
5. Degradasi Hidrokarbon Naftalena	18
B. Kerangka Berpikir	20

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional	22
B. Tempat dan Waktu Penelitian	22
C. Metode Penelitian	22
D. Prosedur Penelitian	23
1. Bahan dan Alat	23

2. Cara Kerja	24
a. Pembuatan Medium	24
b. Sterilisasi Peralatan dan Medium	24
c. Pengambilan Sampel	24
d. Kultur Pengayaan	25
e. Isolasi Bakteri	25
f. Purifikasi Bakteri.....	26
g. Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan.....	27
1) <i>Blood Haemolysis Test</i>	27
2) Pembuatan Kultur Cair.....	27
3) <i>Drop Collapsing Test</i>	27
4) <i>Oil Displacement Test</i>	28
h. Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan.....	28
1) Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel	28
2) Uji Kemampuan Tumbuh pada Medium Naftalena.....	29
i. Pembuatan Stock Culture.....	31
E. Teknik Pengumpulan Data	32
F. Teknik Analisis Data.....	32

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Isolat Bakteri dari Tanah Tercemar Hidrokarbon	33
2. Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan.....	38
a. <i>Blood Haemolysis Test</i>	38
b. <i>Drop Collapsing Test</i>	41
c. <i>Oil Displacement Test</i>	44
3. Penentuan Bakteri Penghasil Biosurfaktan	46
4. Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan	48
a. Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel.....	48
b. Uji Kemampuan Tumbuh pada Medium Naftalena.....	51

BAB V KESIMPULAN, IMPLIKASI, DAN SARAN

A. Kesimpulan	55
B. Implikasi	55
C. Saran	56

DAFTAR PUSTAKA..... 57

LAMPIRAN..... 65

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur kimia dari biosurfaktan yang paling umum	8
Gambar 2. Akumulasi biosurfaktan di antar muka cairan dengan udara	9
Gambar 3. Hubungan antara konsentrasi biosurfaktan, tegangan permukaan, dan pembentukan misel	10
Gambar 4. Struktur kimia naftalena.....	19
Gambar 5. Metode purifikasi <i>quadrant streak</i>	26
Gambar 6. Uji kemampuan tumbuh pada medium naftalena dengan teknik sublimasi kristal naftalena.....	30
Gambar 7. Prosedur penelitian.	31
Gambar 8. Pertumbuhan koloni dalam medium MSM + minyak mentah (A) dan medium MSM + oli bekas (B)	35
Gambar 9. Beberapa isolat bakteri yang memiliki kemampuan hemolitik	40
Gambar 10. Hasil uji <i>drop collapsing</i> dalam mikroplate	43
Gambar 11. Hasil positif uji <i>oil displacement</i>	45
Gambar 12. Isolat 2Auo-48 dan isolat 2Buo-61	50
Gambar 13. Isolat 1Acu-3 (A), 1Bcu-13 (B), 2Bcu-24 (C), dan 2Bcu-27 (D) yang tumbuh dalam medium MSM agar + naftalena	52
Gambar 14. Jalur katabolik naftalena oleh bakteri.....	53

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Mikroorganisme penghasil biosurfaktan	13
Tabel 2. Morfologi koloni bakteri yang diisolasi dari lokasi I dan II	37
Tabel 3. Jumlah isolat positif dan negatif uji <i>blood haemolysis</i>	38
Tabel 4. Hasil pengukuran diameter tetesan supernatan dari 64 isolat pada uji <i>drop collapsing</i>	42
Tabel 5. Rekapitulasi data hasil uji <i>blood haemolysis</i> , <i>drop</i> <i>collapsing</i> , dan <i>oil displacement</i> dari ke-64 isolat.	46
Tabel 6. Morfologi koloni bakteri penghasil biosurfaktan.....	49
Tabel 7. Morfologi sel bakteri penghasil biosurfaktan.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data Pencemaran oleh PAH di Teluk Jakarta	65
Lampiran 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel.....	66
Lampiran 3. Pembuatan Medium	67
Lampiran 4. Tabel Morfologi Koloni yang Diisolasi dari Tanah Tercemar Hidrokarbon	68
Lampiran 5. Tabel Data Rekapitulasi Hasil Uji <i>Blood Haemolysis,</i> <i>Drop Collapsing</i> , dan <i>Oil Displacement</i> dari ke-64 Isolat	71
Lampiran 6. Tabel Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan	73

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kemajuan industri saat ini menimbulkan dampak buruk bagi lingkungan dan organisme hidup. Limbah hasil proses industri yang mengandung zat-zat berbahaya telah mencemari tanah dan perairan. Salah satu limbah yang banyak mencemari lingkungan adalah minyak bumi. Minyak bumi terdiri dari alkana, sikloalkana, aromatik, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), dan senyawa hidrokarbon lainnya yang bersifat racun bagi lingkungan (Heul, 2009). Berbagai teknik telah digunakan untuk menanggulangi pencemaran minyak, baik secara fisik, kimia, maupun biologi. Dari ketiganya, penanggulangan secara biologi dengan bioremediasi menggunakan mikroorganisme menunjukkan potensi yang besar karena ramah lingkungan dan hemat biaya (Wang *et al.*, 2011).

Bioremediasi didefinisikan sebagai penggunaan organisme hidup untuk membersihkan tumpahan minyak atau menghilangkan polutan lainnya dari tanah, air, atau limbah (*Environmental Protection Agency Terms of Environment Dictionary*, 2008). Bioremediasi bergantung pada proses metabolisme bakteri, jamur, atau tanaman untuk menggunakan kontaminan sebagai sumber energi dan mengubahnya menjadi produk yang tidak berbahaya (Donlon dan Bauder, 2011). Keberhasilan dari

proses ini bergantung pada ketersediaan mikroorganisme, aksesibilitas kontaminan, dan kondusifitas lingkungan. Beberapa spesies atau strain mikroba tertentu diketahui dapat mendegradasi hidrokarbon dan memanfaatkan senyawa karbon yang dihasilkan sebagai sumber makanan dan energi untuk pertumbuhan dan reproduksi (Wang *et al.*, 2011). Namun, terdapat faktor yang seringkali membatasi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon, yaitu sifat kelarutannya yang rendah sehingga sulit mencapai sel mikroorganisme.

Biodegradasi akan maksimal ketika substrat yang tidak larut dalam air menjadi terlarut atau teremulsi (Maneerat dan Phetrong, 2007). Upaya yang umum digunakan untuk meningkatkan kelarutan hidrokarbon adalah dengan pemberian surfaktan sintetis. Surfaktan atau senyawa aktif permukaan adalah kelompok bahan kimia yang terdiri dari bagian polar yang larut dalam air, dan bagian non-polar yang tidak larut dalam air (Ivanković dan Hrenović, 2010). Penggunaan surfaktan sintetis menimbulkan masalah bagi organisme hidup karena bersifat toksik, *non-degradable*, serta dapat menghambat proses degradasi oleh mikroorganisme (Fatimah, 2007). Beberapa contoh surfaktan sintetis yang bersifat toksik yaitu *sodium dodecyl sulphate* (SDS), *linear alkylbenzene sulphonic acid* (LAS), *alcohol ethoxylate* (AE), dan *alkyl ethoxysulphate* (AES) (Ivanković dan Hrenović, 2010).

Alternatif lain untuk meningkatkan biodegradasi hidrokarbon adalah dengan menggunakan biosurfaktan, yaitu senyawa aktif permukaan yang

dihasilkan oleh mikroorganisme (Salihu *et al.*, 2009). Penggunaan biosurfaktan mempunyai keuntungan lebih dibanding penggunaan surfaktan sintetis, karena sifatnya yang tidak toksik dan dapat didegradasi oleh mikroorganisme. Biosurfaktan dapat meningkatkan bioavailabilitas hidrokarbon yang menyebabkan peningkatan pertumbuhan dan degradasi kontaminan oleh bakteri pengurai hidrokarbon pada lingkungan yang tercemar (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011). Bakteri adalah kelompok utama dari mikroorganisme penghasil biosurfaktan, di samping kapang dan khamir (Aparna *et al.*, 2012). Bakteri memiliki waktu pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan kapang dan khamir, sehingga lebih efisien untuk diaplikasikan dalam teknik bioremediasi. Beberapa spesies bakteri yang mampu menghasilkan biosurfaktan adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Arthrobacter paraffineus*, dan *Corynebacterium lepus* (Kaloorazi dan Choobari, 2013).

Berdasarkan berbagai penelitian yang telah dilakukan, bakteri penghasil biosurfaktan diketahui dapat diisolasi dari tempat penampungan minyak, tanah yang tercemar minyak, pelabuhan, dermaga, maupun bengkel mobil (Tabatabaei *et al.*, 2005; Jaysree *et al.*, 2011; Maneerat dan Phetrong, 2007; Anandaraj dan Thivakaran, 2010; Shoeb *et al.*, 2012). Salah satu lokasi yang tercemar berbagai macam limbah di Jakarta adalah Teluk Jakarta. Menurut data dari Badan Pengendalian Dampak Lingkungan, dalam 10 tahun terakhir Teluk Jakarta telah mengalami pencemaran yang melebihi ambang batas. Sungai-sungai yang bermuara

ke Teluk Jakarta membawa berbagai macam jenis limbah yang bersifat toksik ke perairan Teluk Jakarta, di antaranya adalah senyawa PAH. Kadar total PAH tertinggi di Teluk Jakarta pada tahun 2012 mencapai 474,68 ppb (Ahmad, 2012; Lampiran 1).

Isolasi dan seleksi bakteri penghasil biosurfaktan ini dilakukan sebagai langkah awal untuk mendapatkan agen bioremediasi hidrokarbon yang potensial. Isolat yang diperoleh diharapkan dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mengatasi pencemaran hidrokarbon khususnya di Teluk Jakarta.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, masalah yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat bakteri penghasil senyawa biosurfaktan dari lokasi tercemar hidrokarbon di kawasan Teluk Jakarta?
2. Bagaimanakah karakteristik bakteri penghasil biosurfaktan yang didapatkan?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil senyawa biosurfaktan dari lokasi tercemar hidrokarbon di kawasan Teluk Jakarta.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diperolehnya isolat bakteri yang mampu menghasilkan senyawa biosurfaktan. Isolat bakteri tersebut kemudian akan diteliti lebih lanjut kemampuannya dalam mendegradasi hidrokarbon.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERPIKIR

A. Kajian Pustaka

1. Senyawa Aktif Permukaan atau Surfaktan

Senyawa aktif permukaan (surfaktan) adalah molekul amfifilik dengan struktur bipolar (memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik), yang dapat menurunkan tegangan permukaan dan tegangan antar muka cairan, dan memiliki kemampuan untuk membentuk misel dan mikroemulsi antara dua fase yang berbeda (Franzetti *et al.*, 2010). Sebuah molekul surfaktan dibentuk oleh dua bagian dengan afinitas yang berbeda sebagai pelarut. Satu bagian memiliki afinitas untuk air (pelarut polar) dan yang lainnya untuk minyak (pelarut non-polar). Ketika dilarutkan dalam air pada konsentrasi rendah, surfaktan hadir sebagai monomer. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi, molekul surfaktan teragregasi menjadi misel. Konsentrasi ambang saat pembentukan misel terjadi disebut sebagai *critical micelle concentration* atau CMC (Ivanković dan Hrenović, 2010).

Senyawa aktif permukaan sangat umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Surfaktan banyak digunakan dalam bidang industri, pertanian, pangan, kosmetik, dan farmasi namun sebagian besar senyawa ini disintesis secara kimia dan berpotensi menimbulkan masalah lingkungan dan toksikologi karena sifatnya yang rekalsitran dan persisten (Fakruddin, 2012). Salah satu upaya untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan

menggunakan surfaktan ramah lingkungan yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

2. Biosurfaktan

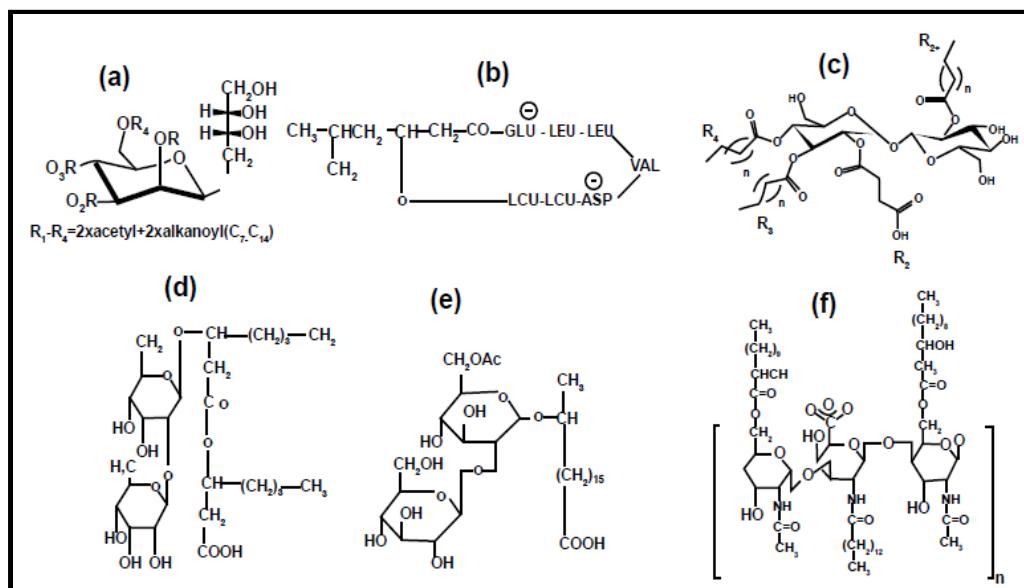
Biosurfaktan adalah senyawa aktif permukaan yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Shoeb *et al.*, 2012). Biosurfaktan bersifat amfifilik, terdiri atas bagian polar (hidrofilik) dan bagian non polar (hidrofobik). Kelompok hidrofilik terdiri dari mono-, oligo- atau polisakarida, peptida atau protein, dan bagian hidrofobik biasanya mengandung asam lemak jenuh, asam lemak tak jenuh, dan asam lemak atau alkohol lemak terhidroksilasi (Lang, 2002).

a. Klasifikasi Biosurfaktan

Biosurfaktan dikelompokkan berdasarkan struktur kimia, berat molekul, sifat fisiko-kimia, cara kerja, dan asal mikroba. Biosurfaktan dibagi menjadi enam kelas: asam lemak terhidroksilasi (asam mikolat), glikolipid, lipopolisakarida, lipoprotein-lipopeptida, fosfolipid, dan permukaan sel lengkap itu sendiri (Saharan *et al.*, 2011). Glikolipid yang paling banyak diketahui adalah rhamnolipid, sophorolipid, dan trehalolipid (Fakruddin, 2012).

Berdasarkan berat molekul, biosurfaktan dibagi menjadi biosurfaktan bermassa molekul rendah (glikolipid, fosfolipid, dan lipopeptida) dan biosurfaktan bermassa molekul tinggi (polisakarida amfifatik, protein,

lipopolisakarida, lipoprotein atau campuran kompleks biopolimer tersebut). Biosurfaktan bermassa molekul rendah efisien dalam menurunkan tegangan permukaan dan tegangan antar muka, sedangkan biosurfaktan bermassa molekul tinggi lebih efektif dalam menstabilkan emulsi minyak dalam air (Calvo *et al.*, 2009).

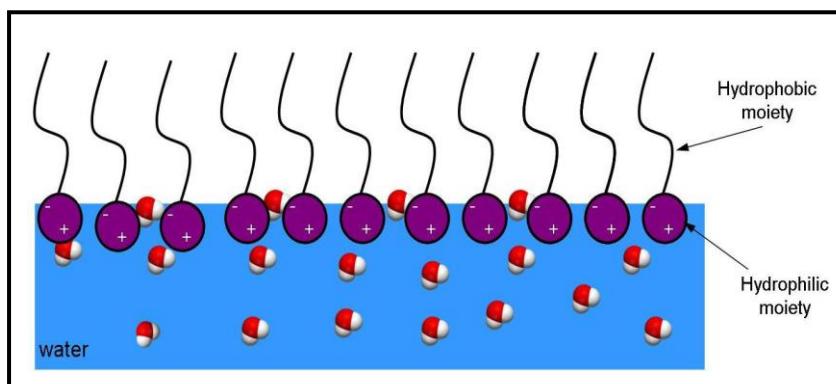


Gambar 1. Struktur kimia dari biosurfaktan yang paling umum (a) Lipid mannosylerythritol (b) Surfaktin (c) Lipid trehalosa (d) Sophorolipid (e) Rhamnolipid (f) Emulsan (Fakruddin, 2012).

b. Mekanisme Kerja Biosurfaktan

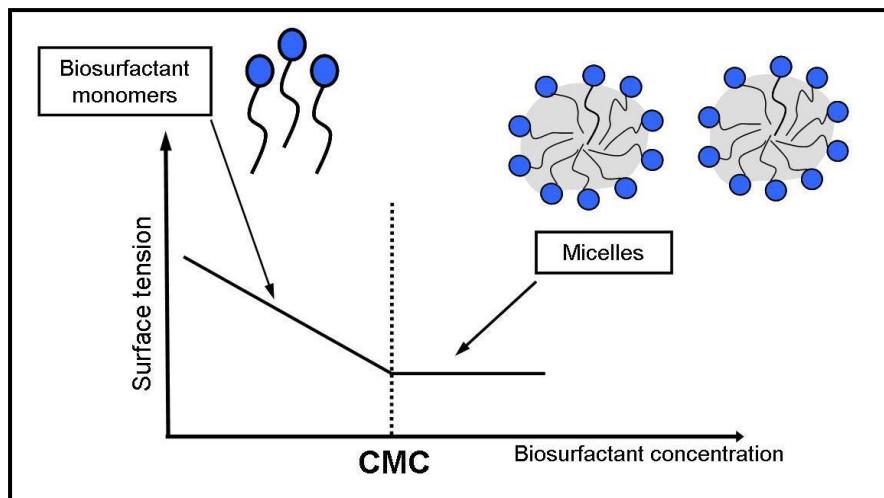
Biosurfaktan terakumulasi di antar muka antara dua cairan yang tidak bercampur atau antara cairan dan padatan. Biosurfaktan mampu menurunkan tegangan permukaan antara cairan dengan udara (Gambar 2) dan antar muka cairan dengan cairan, sehingga memungkinkan kedua

fase tersebut untuk bercampur dan berinteraksi dengan lebih mudah (Soberón-Chávez dan Maier, 2011).



Gambar 2. Akumulasi biosurfaktan di antar muka cairan dengan udara (Soberón-Chávez dan Maier, 2011).

Biosurfaktan yang paling aktif dapat menurunkan tegangan permukaan air dari $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ menjadi $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dan tegangan antar muka antara air dan *n*-heksadekana dari $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ menjadi $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Soberón-Chávez dan Maier, 2011). Aktivitas biosurfaktan tergantung pada konsentrasi hingga nilai *critical micelle concentration* (CMC) tercapai. Pada konsentrasi di atas CMC, molekul biosurfaktan berasosiasi untuk membentuk misel, bilayer, dan vesikula. Pembentukan misel memungkinkan biosurfaktan untuk menurunkan tegangan permukaan dan tegangan antar muka serta meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas senyawa organik hidrofobik (Whang *et al.*, 2008).



Gambar 3. Hubungan antara konsentrasi biosurfaktan, tegangan permukaan, dan pembentukan misel (Whang et al., 2008).

Nilai CMC umumnya digunakan untuk mengukur efisiensi surfaktan. Biosurfaktan yang efisien memiliki nilai CMC rendah, yang berarti bahwa sedikit biosurfaktan diperlukan untuk menurunkan tegangan permukaan (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Pembentukan misel memiliki peran penting dalam pembentukan mikroemulsi (Nguyen *et al.*, 2008). Mikroemulsi adalah campuran cairan bening dan stabil dari domain air dan minyak yang dipisahkan oleh monolayer atau agregat biosurfaktan. Mikroemulsi terbentuk ketika salah satu fase cair tersebar sebagai tetesan dalam fase cair lain, misalnya minyak terdispersi dalam air (mikroemulsi langsung) atau air terdispersi dalam minyak (mikroemulsi terbalik/reversed *microemulsion*) (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

c. Peran Biosurfaktan

Sifat khas biosurfaktan seperti toksisitas rendah, mudah dibuat, dan penerapan yang luas membuat biosurfaktan berbeda dari surfaktan sintetis dan sekarang telah menjadi produk bioteknologi yang penting untuk aplikasi industri dan medis (Sanket dan Yagnik, 2013). Biosurfaktan sebagian besar diaplikasikan dalam bidang industri minyak, makanan, dan kosmetik, serta agen terapeutik. Rhamnolipid yang diproduksi oleh *Pseudomonas aeruginosa*, lipopeptida yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* dan *B. licheniformis*, dan lipid mannosylerythritol dari *Candida antarctica* telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba (Rodrigues *et al.*, 2006).

Beberapa aplikasi biosurfaktan dalam pengendalian polusi di lingkungan adalah degradasi hidrokarbon di lingkungan tanah, *microbially-enhanced oil recovery* (MEOR), degradasi heksaklorosikloheksana, penghapusan logam berat dari tanah yang terkontaminasi, dan penghapusan hidrokarbon dari lingkungan perairan yang terkontaminasi (Sanket dan Yagnik, 2013). Biosurfaktan juga memiliki beberapa aplikasi dalam industri makanan sebagai *food additive*. Peningkatan stabilitas adonan, tekstur, dan volume produk roti diperoleh dengan penambahan biosurfaktan rhamnolipid (Nitschke dan Costa, 2007). Selain itu, biosurfaktan juga dimanfaatkan dalam industri kosmetik sebagai bahan campuran dalam sampo dan produk-produk perawat kulit karena sifatnya yang melembabkan dan aman bagi kulit (Kaloorazi dan Choobari, 2013).

d. Mikroorganisme Penghasil Biosurfaktan

Biosurfaktan diproduksi oleh berbagai mikroorganisme terutama bakteri, jamur, dan khamir (Tabel 1). Sifat dan jumlah biosurfaktan tergantung pada jenis mikroorganisme penghasil biosurfaktan tertentu. Banyak mikroorganisme yang digunakan untuk pemanfaatan limbah industri telah diisolasi dari tanah yang terkontaminasi, buangan limbah, dan sumber air limbah. Mikroorganisme penghasil biosurfaktan memiliki kemampuan untuk tumbuh pada substrat yang dianggap berpotensi berbahaya bagi mikroorganisme non-produsen (Saharan *et al.*, 2011).

Biosurfaktan diproduksi oleh berbagai mikroorganisme dengan cara disekresikan secara ekstraselular atau melekat pada bagian sel terutama selama pertumbuhan dalam substrat yang tidak dapat bercampur dengan air. Peran fisiologis utama biosurfaktan adalah untuk memungkinkan mikroorganisme untuk tumbuh pada substrat yang tidak dapat bercampur dengan air dengan cara mengurangi tegangan permukaan pada batas fase, sehingga membuat substrat lebih mudah tersedia untuk proses penyerapan dan metabolisme. Namun, mekanisme molekuler terkait dengan penyerapan substrat tersebut oleh mikroorganisme masih tidak jelas dan belum sepenuhnya dipahami (Fakruddin, 2012).

Tabel 1. Mikroorganisme penghasil biosurfaktan (Saharan et al., 2011).

No.	Biosurfaktan	Mikroorganisme	Kegunaan
1.	Lipid selobiosa	<i>Ustilago maydis</i>	Senyawa antijamur
2.	Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>	Pengemulsi hidrokarbon
3.	Lipid poliol	<i>Rhodotorula glutinis, R. graminis</i>	Anti-proliferasi
4.	Lipid trehalosa	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.	Pelarut hidrokarbon
5.	Lipid ornitin	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Bio-emulsifier</i>
6.	Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteroids</i>	Lipopeptida aktif permukaan
7.	Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Serratia rubidea</i>	Bioremediasi, agen antimikroba dan biokontrol
8.	Lipid-karbohidrat	<i>P. fluorescens</i> , <i>Debaryomyces polymorphus</i>	<i>Bio-emulsifier</i>
9.	Protein PA	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Bio-emulsifier</i>
10.	Diglycosyl diglycerida	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Bioremediasi
11.	Sel utuh	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Bio-flocculent</i>
12.	Asam lemak/lipid netral	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Insidiosus</i>	<i>Bio-emulsifier</i>
13.	Sophorolipid	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. antartica</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>C. botistae</i> , <i>C. apicola</i> , <i>C. riodocensis</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. Bogoriensis</i>	Antimikroba, antivirus, spermisida
14.	Liposan	<i>C. tropicalis</i>	Bio-emulsan
15.	Lipid mannosylerythritol	<i>C.antartica</i> , <i>Kurtzmanomyces</i> sp., <i>Pseudozyma siamensis</i>	Senyawa antijamur
16.	Surfaktin/liturin	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Agen antimikroba
17.	Subtilisin	<i>B. subtilis</i>	Agen antimikroba
18.	Lipid asam amino	<i>Bacillus</i> sp.	Agen antimikroba
19.	Lichenysin	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. Subtilis</i>	<i>Microbially enhanced oil recovery (MEOR)</i>
20.	Peptida lipid	<i>B. licheniformis</i>	Agen antimikroba
21.	Fosfolipid	<i>Acinetobacter</i> sp.	Bioremediasi
22.	Vesicle & fimbriae	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>P. marginilis</i> , <i>P. maltophilia</i>	Bioremediasi
23.	Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Microbially enhanced oil recovery (MEOR)</i>
24.	Alasan	<i>A. radioresistens</i>	Biodegradasi senyawa polaromatik

3. Metode Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Biosurfaktan memiliki sifat yang khas dan aplikasi yang luas sehingga seleksi dan identifikasi mikroorganisme penghasil biosurfaktan saat ini menjadi suatu kebutuhan. Menurut Thavasi *et al.* (2011), ada 9 metode berbeda yang digunakan untuk menyeleksi mikroorganisme penghasil biosurfaktan. Kesembilan metode tersebut yaitu *blood haemolysis test*, *bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test*, *drop collapsing test*, *oil spreading test*, uji emulsifikasi, pengukuran tegangan permukaan, *tilted glass slide test*, *blue agar plate*, dan *hydrocarbon overlay agar test*. Metode seleksi mikroorganisme penghasil biosurfaktan dapat memberikan hasil kualitatif maupun kuantitatif. Menurut Walter *et al.* (2010), metode kualitatif sudah cukup memadai sebagai tahap seleksi awal terhadap isolat. Penelitian ini menggunakan 3 metode kualitatif, yaitu *blood haemolysis test*, *drop collapsing test*, dan *oil displacement test* atau *oil spreading test*.

a. *Blood Haemolysis Test*

Uji *blood haemolysis* adalah uji kualitatif yang digunakan untuk mendekripsi biosurfaktan. Isolat digoreskan pada permukaan medium *blood agar* dan diinkubasi pada suhu yang diperlukan selama 48 jam. Keberadaan zona bening (hemolisis) di sekitar koloni diamati secara visual (Satpute *et al.*, 2010). Hemolisis merupakan indikasi lisisnya sel darah merah akibat pecahnya membran sel yang disebabkan oleh adanya

molekul aktif permukaan (Satpute *et al.*, 2010). Mulligan *et al.* merekomendasikan uji *blood haemolysis* sebagai metode seleksi awal yang harus ditunjang dengan metode lain yang didasari oleh pengukuran aktivitas permukaan (Walter *et al.*, 2010).

b. *Drop Collapsing Test*

Uji *drop collapsing* adalah metode yang sensitif dan mudah untuk dilakukan. Metode ini hanya membutuhkan sejumlah kecil (~5µl) supernatan dari kultur isolat untuk menguji keberadaan biosurfaktan (Thavasi *et al.*, 2011). Uji *drop collapsing* dikembangkan oleh Jain *et al.* Pengujian ini bergantung pada destabilisasi tetesan cairan oleh surfaktan. Supernatan diteteskan di atas permukaan solid yang dilapisi minyak. Jika cairan supernatan tidak mengandung surfaktan, molekul air yang polar akan ditolak dari permukaan hidrofobik dan tetesan akan tetap stabil. Jika cairan supernatan mengandung surfaktan, tetesan akan menyebar atau *collapse* karena tegangan permukaan antara tetesan supernatan dan permukaan hidrofobik mengalami penurunan (Walter *et al.*, 2010).

c. *Oil Displacement Test*

Uji *oil displacement* dikembangkan oleh Morikawa *et al.* Pengujian ini menggunakan *crude oil* (minyak mentah) yang diteteskan ke atas permukaan akuades dalam cawan petri hingga membentuk lapisan tipis. Kemudian supernatan dari kultur isolat diletakkan secara hati-hati di atas

lapisan minyak. Jika supernatan mengandung biosurfaktan, minyak akan terusir dan zona bening terbentuk. Metode *oil displacement* merupakan metode yang cepat dan mudah untuk dilakukan, dan hanya membutuhkan sampel dalam volume yang sedikit (Walter *et al.*, 2010). Youssef *et al.* (2004) dan Plaza *et al.* (2006) menunjukkan bahwa metode *oil displacement* adalah metode yang handal untuk mendeteksi produksi biosurfaktan oleh beragam mikroorganisme.

4. Biosurfaktan dan Degradasi Hidrokarbon

Hidrokarbon adalah senyawa organik yang hanya tersusun atas atom karbon dan atom hidrogen. Hidrokarbon minyak bumi terdiri dari campuran kompleks komponen non-cair dan komponen hidrofobik seperti n-alkana, aromatik, resin, dan asphaltene (Grace *et al.*, 2011). Produksi dan penggunaan hidrokarbon telah mengakibatkan pencemaran lingkungan secara luas. Pencemaran lingkungan yang disebabkan oleh minyak bumi menjadi perhatian besar karena hidrokarbon minyak bumi bersifat racun bagi semua bentuk kehidupan (Romero-Zeron *et al.*, 2012). Oleh karena itu, bioremediasi dilakukan sebagai upaya penanggulangan pencemaran hidrokarbon di lingkungan. Namun, hidrokarbon sebagai bahan kimia organik hidrofobik memiliki kelarutan terbatas dalam air, sehingga menjadi hambatan dalam proses bioremediasi.

Biosurfaktan dapat meningkatkan biodegradasi hidrokarbon dengan dua mekanisme; yang pertama mencakup peningkatan bioavailabilitas

substrat bagi mikroorganisme, sementara yang lain melibatkan interaksi dengan permukaan sel yang meningkatkan hidrofobisitas permukaan sehingga memungkinkan substrat hidrofobik untuk berasosiasi lebih mudah dengan sel bakteri (Mulligan dan Gibbs, 2004). Peningkatan bioavailabilitas substrat hidrofobik dapat terjadi melalui tiga mekanisme berikut:

- Mobilisasi

Mekanisme mobilisasi terjadi pada konsentrasi di bawah nilai CMC biosurfaktan. Pada konsentrasi tersebut, biosurfaktan mengurangi tegangan permukaan antara sistem udara-air dan tegangan antar muka tanah-air. Karena pengurangan tegangan antar muka, kontak biosurfaktan dengan sistem tanah-minyak meningkatkan sudut kontak dan mengurangi gaya kapiler yang menahan minyak dan tanah (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

- Solubilisasi

Proses solubilisasi berlangsung di atas nilai CMC biosurfaktan. Pada konsentrasi ini, molekul-molekul biosurfaktan berasosiasi untuk membentuk misel, yang secara dramatis meningkatkan kelarutan minyak. Ujung-ujung hidrofobik molekul biosurfaktan terhubung bersama-sama dalam misel sementara ujung hidrofilik terkena fase berair pada bagian eksterior. Akibatnya, interior misel menciptakan lingkungan yang kompatibel untuk molekul organik hidrofobik. Proses penggabungan

molekul ini ke dalam misel dikenal sebagai solubilisasi (Urum dan Pekdemir, 2004).

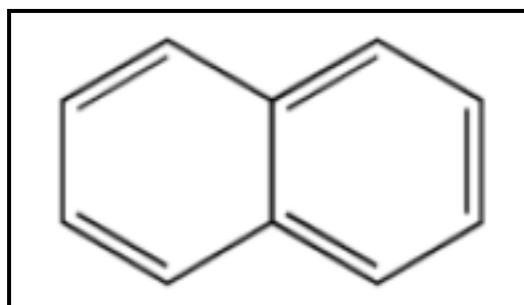
- Emulsifikasi

Emulsifikasi adalah proses yang membentuk cairan (emulsi) yang mengandung tetesan sangat kecil dari lemak atau minyak yang tersuspensi dalam cairan, biasanya air. Biosurfaktan dengan berat molekul yang tinggi adalah agen pengemulsi yang efisien. Biosurfaktan ini sering digunakan sebagai bahan tambahan untuk menstimulasi bioremediasi dan penghilangan minyak dari lingkungan (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

5. Degradasi Hidrokarbon Naftalena

Naftalena adalah senyawa organik dengan rumus $C_{10}H_8$, yang merupakan PAH sederhana berwujud kristal putih solid dengan karakteristik bau yang khas (Sahoo, 2009). Naftalena berasal dari tar batubara atau minyak mentah. Struktur naftalena terdiri dari dua cincin benzena yang menggabungkan diri (Gambar 4). Pemanfaatan utama dari naftalena adalah sebagai bahan baku ftalat anhidrida yang umum digunakan dalam produksi pewarna, plastik, insektisida, dan beberapa produk farmasi (Wakefield, 2007). Naftalena adalah polutan lingkungan yang telah tersebar di mana-mana. Sejak tahun 2000, naftalena telah menimbulkan masalah besar bagi lingkungan karena memiliki efek karsinogenik yang signifikan berdasarkan investigasi paparan naftalena pada hewan (Preuss *et al.*, 2003).

Paparan naftalena telah dikaitkan dengan sejumlah efek kesehatan yang merugikan, yaitu di antaranya hiperplasia dan metaplasia pada epitel respiratori dan olfaktori, serta tumor hidung (Jia dan Batterman, 2010). Paparan akut oleh naftalena dapat menyebabkan efek samping seperti mual, muntah, sakit perut, diare, sakit kepala, berkeringat banyak, demam, takikardia, takipnea, dan agitasi yang dapat menyebabkan kejang-kejang dan koma. Paparan naftalena pada kulit dapat menyebabkan iritasi kulit ringan dan dermatitis pada individu yang sensitif. Sedangkan paparan naftalena pada mata dapat menyebabkan iritasi mata, kerusakan kornea, pembentukan kekeruhan lensa dan katarak (Wakefield, 2007).



Gambar 4. Struktur kimia naftalena
(Wakefield, 2007).

Naftalena bersumber dari emisi industri kimia dan logam, pembakaran biomassa, pembakaran minyak dan bensin, asap rokok, penggunaan kapur barus, fumigan dan pengharum, serta sumber-sumber lainnya (Jia dan Batterman, 2010). Beberapa bakteri yang mampu mendegradasi naftalena berasal dari genus *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*,

Sphingomonas, dan *Streptomyces* (Seo *et al.*, 2009). Biosurfaktan dapat meningkatkan degradasi naftalena dengan cara mengemulsi substrat naftalena sehingga lebih mudah digunakan oleh sel bakteri (Tuleva *et al.*, 2005)

B. Kerangka Berpikir

Pencemaran lingkungan oleh limbah industri saat ini semakin memprihatinkan. Salah satu limbah yang banyak mencemari lingkungan dan berbahaya bagi organisme hidup adalah minyak bumi (*crude oil*). Minyak bumi terdiri dari alkana, sikloalkana, aromatik, poliaromatik (PAH), dan senyawa hidrokarbon lainnya yang bersifat racun bagi lingkungan. Teknik bioremediasi menggunakan mikroorganisme memiliki potensi yang besar dalam menanggulangi pencemaran minyak karena ramah lingkungan dan hemat biaya. Bioremediasi bertujuan untuk mendegradasi, mengubah, atau menghilangkan kontaminan dari tanah dan air.

Beberapa spesies atau strain mikroba tertentu diketahui dapat mencerna dan memanfaatkan hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan dan reproduksi. Namun, terdapat faktor yang membatasi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon, yaitu sifat kelarutannya yang rendah sehingga sulit mencapai sel mikroorganisme. Bakteri tertentu mampu menghasilkan biosurfaktan, yaitu suatu senyawa yang dapat meningkatkan kelarutan hidrokarbon dalam air, tetapi tidak bersifat toksik bagi organisme hidup dan mudah

terdegradasi. Biosurfaktan diketahui mampu meningkatkan degradasi hidrokarbon minyak bumi.

Mikroorganisme penghasil biosurfaktan dapat diisolasi dari lokasi tercemar limbah minyak karena menghasilkan biosurfaktan sebagai upaya memperoleh sumber karbon. Salah satu lokasi yang tercemar berbagai macam limbah domestik dan industri di kawasan Jakarta dan sekitarnya adalah Teluk Jakarta. Oleh karena itu, diharapkan akan didapatkan isolat bakteri penghasil biosurfaktan dari lokasi tercemar hidrokarbon di kawasan Teluk Jakarta.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional

Tujuan operasional penelitian ini adalah:

1. Melakukan isolasi bakteri penghasil biosurfaktan dari lokasi tercemar hidrokarbon di kawasan Teluk Jakarta.
2. Melakukan seleksi bakteri penghasil biosurfaktan dengan metode *blood haemolysis test*, *drop collapsing test*, dan *oil displacement test*.
3. Melakukan karakterisasi terhadap isolat yang positif menghasilkan biosurfaktan dengan pengamatan morfologi koloni dan pewarnaan Gram, dan uji kemampuan tumbuh pada medium naftalena.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, Jurusan Biologi Universitas Negeri Jakarta, pada bulan Februari-Juli 2014. Pengambilan sampel dilakukan di dua lokasi tercemar hidrokarbon di Cilincing, Jakarta Utara (Lampiran 2).

C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif.

D. Prosedur Penelitian

1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi medium MSM (*Mineral Salt Medium*) dengan komposisi berdasarkan Kumar *et al.* (2006a) yaitu Na₂HPO₄ (6 g/L), KH₂PO₄ (3 g/L), NH₄Cl (1 g/L), NaCl (1 g/L), MgSO₄ 1 M (1 mL/L), *trace element* (2,5 mL/L) dengan komposisi MnCl₂.2H₂O (23 mg/L), MnCl₄.H₂O (30 mg/L), H₃BO₃ (31 mg/L), CoCl₂.6H₂O (36 mg/L), CuCl₂.2H₂O (10 mg/L), NiCl₂.6H₂O (20 mg/L), Na₂MoO₄.2H₂O (30 mg/L), ZnCl₂ (50 mg/L); NA (*Nutrient Agar*), *bacto agar*, *blood agar*, NB (*Nutrient Broth*), minyak mentah (*crude oil*), oli bekas, akuades, naftalena, aseton, gliserol 60%, alkohol 70%, larutan *crystal violet* (Gram A), *iodine* (Gram B), *ethanol* 95% (Gram C), safranin (Gram D), *aluminium foil*, karet, label, plastik, kapas, dan tisu.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari cawan petri, tabung reaksi, botol selai, erlenmeyer, gelas ukur, gelas Beaker, mikropipet, tip, autoklaf, gelas objek, kaca penutup, rak tabung reaksi, lampu spirtus, ose, spatula, mikroplate, neraca analitik, *magnetic stirrer*, tabung Eppendorf, tabung *cryo*, *deep freezer*, *centrifuge*, *rotary shaker*, inkubator, mikroskop, *laminar air flow cabinet*, dan lemari pendingin.

2. Cara Kerja

a. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan terdiri dari MSM (*Mineral Salt Medium*), NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), dan *blood agar*. Pembuatan medium dapat dilihat pada Lampiran 3.

b. Sterilisasi Peralatan dan Medium

Cawan petri dimasukkan ke dalam plastik tahan panas, tip dimasukkan ke dalam wadah botol selai yang ditutup dengan kertas *yellow pages*. Erlenmeyer berisi medium diberi label dan ditutup dengan sumbat kapas yang dibalut kertas *yellow pages*. Tabung reaksi berisi medium NA dan NB masing-masing diberi sumbat kapas, dan dimasukkan ke dalam gelas Beaker yang kemudian ditutup dengan kertas *yellow pages*. Proses sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit berdasarkan Benson (2001).

c. Pengambilan Sampel

Sampel tanah/lumpur diambil dari dua lokasi berbeda yang tercemar minyak, yaitu di tepi sungai dan pelabuhan kapal nelayan di daerah Cilincing yang bermuara ke Teluk Jakarta. Penentuan titik pengambilan sampel didasari pada kondisi pencemaran pada perairan dan tanah/lumpur atau sedimen di sekitar lokasi. Sampel diambil pada kedalaman ± 10 cm menggunakan sendok steril dan dimasukkan ke

dalam botol selai steril yang ditutup rapat (Belcher *et al.*, 2012). Selanjutnya sampel dibawa ke laboratorium dengan menggunakan boks pendingin.

d. Kultur Pengayaan

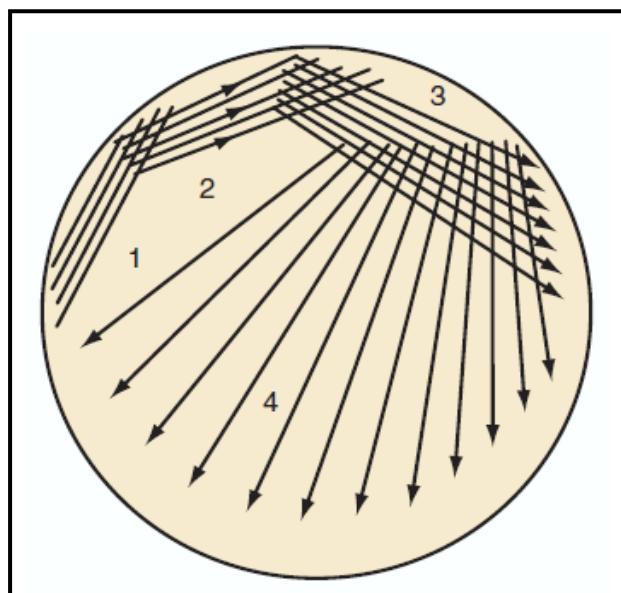
Sebanyak 5 g dari setiap sampel tanah dimasukkan ke dalam botol selai berisi 50 mL MSM + 1% minyak mentah, dan 50 mL MSM + 1% oli bekas. Masing-masing botol selai yang telah berisi sampel dan medium kemudian diinkubasi selama 14 hari dalam *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang (modifikasi dari Shoeb *et al.*, 2012; Belcher *et al.*, 2012; Saimmai *et al.*, 2012; Aparna *et al.*, 2012).

e. Isolasi Bakteri

Proses isolasi dilakukan dengan metode cawan tuang (*pour plate method*). Sebanyak 0,1 mL suspensi dari masing-masing botol pada tahap pengayaan (Shoeb *et al.*, 2012) dimasukkan ke dalam cawan petri steril (duplo) menggunakan mikropipet. Kemudian cawan petri yang telah berisi sampel dari medium MSM yang ditambah dengan minyak mentah diisi dengan medium MSM agar + 1% minyak mentah (Wang *et al.*, 2011), sedangkan cawan petri berisi sampel dari medium MSM yang ditambah oli bekas diisi dengan medium MSM agar + 1% oli bekas (Saimmai *et al.*, 2012). Setelah agar memadat, seluruh cawan selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C (Wang *et al.*, 2011).

f. Purifikasi Bakteri

Koloni berbeda yang tumbuh pada tahap isolasi dideskripsikan dan dipilih berdasarkan perbedaan bentuk, tepian, dan warna, kemudian diambil dan digoreskan ke dalam MSM agar lempeng + 1% minyak mentah (Wang *et al.*, 2011) dan MSM agar lempeng + 1% oli bekas (Saimmai *et al.*, 2012). Agar lempeng tersebut kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C.



Gambar 5. Metode purifikasi *quadrant streak* (Benson, 2001).

Purifikasi dilakukan dengan menginokulasi bakteri yang tumbuh di medium MSM agar lempeng ke medium NA dalam cawan petri dengan metode kuadran (Benson, 2001). Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 30°C. Koloni yang tumbuh terpisah selanjutnya diambil dan diinokulasi ke dalam tabung reaksi berisi NA miring sebagai kultur murni.

Tabung reaksi diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 30°C (Tabatabaei *et al.*, 2005). Setelah proses inkubasi, kultur bakteri disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4°C sampai digunakan pada tahapan selanjutnya (Anandaraj dan Thivakaran, 2010).

g. Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

1) *Blood Haemolysis Test*

Isolat bakteri digoreskan pada permukaan *blood agar*, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 30°C. Aktivitas hemolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Maneerat dan Phetrong, 2007).

2) Pembuatan Kultur Cair

Isolat bakteri dimasukkan ke dalam medium MSM cair + 1% minyak mentah. Kemudian diinkubasi dalam *rotary shaker* 100 rpm pada suhu ruang selama 7 hari (modifikasi dari Anandaraj dan Thivakaran, 2010). Setelah inkubasi, sel-sel bakteri dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan (Angaleswari *et al.*, 2012).

3) *Drop Collapsing Test*

Drop collapsing test dilakukan dengan meneteskan 2 µL minyak mentah ke dalam mikroplate, kemudian dibiarkan selama 1 jam pada

suhu ruang. Setelah itu 5 μL supernatan bakteri ditambahkan ke permukaan minyak. Bentuk tetesan pada permukaan minyak diamati setelah 1 menit. Hasil dianggap positif jika diameter tetesan setidaknya 1 mm lebih besar dari kontrol negatif berupa akuades (Thavasi *et al.*, 2011).

4) *Oil Displacement Test*

Sebanyak 15 mL akuades steril dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian diteteskan 100 μL minyak mentah pada permukaannya. Selanjutnya, 20 μL supernatan bakteri diteteskan secara hati-hati di tengah-tengah lapisan minyak. Zona bening diamati setelah 30 detik (Jaysree *et al.*, 2011).

h. Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

1) Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel

Morfologi koloni yang diamati adalah bentuk, warna, tepian, dan elevasi. Untuk melakukan pengamatan morfologi sel dengan pewarnaan Gram, isolat bakteri diremajakan terlebih dahulu pada medium NA dengan waktu inkubasi 24 jam. Prosedur pewarnaan Gram dilakukan menurut Benson (2001). Sebelum memulai pewarnaan, kaca objek dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% dan dilewatkan di atas lampu spirtus. Selanjutnya diteteskan akuades steril dan dibuat apusan bakteri, kemudian difiksasi. Larutan

crystal violet (Gram A) kemudian diteteskan pada apusan bakteri dan didiamkan selama 20 detik. Setelah itu kaca objek dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Setelah kering, larutan *iodine* (Gram B) diteteskan pada apusan dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya kaca objek dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Kemudian dengan cara yang sama, apusan bakteri diteteskan dengan larutan *ethanol* 95% (Gram C) dan larutan safranin (Gram D). Setelah penetesan, larutan Gram C dan Gram D masing-masing didiamkan selama 20 detik. Setelah dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan, bentuk sel dan tipe Gram dari tiap isolat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000X.

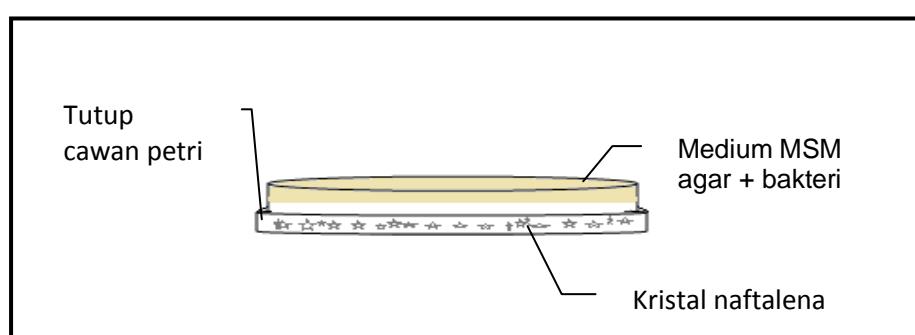
2) Uji Kemampuan Tumbuh pada Medium Naftalena

- Pembuatan larutan naftalena

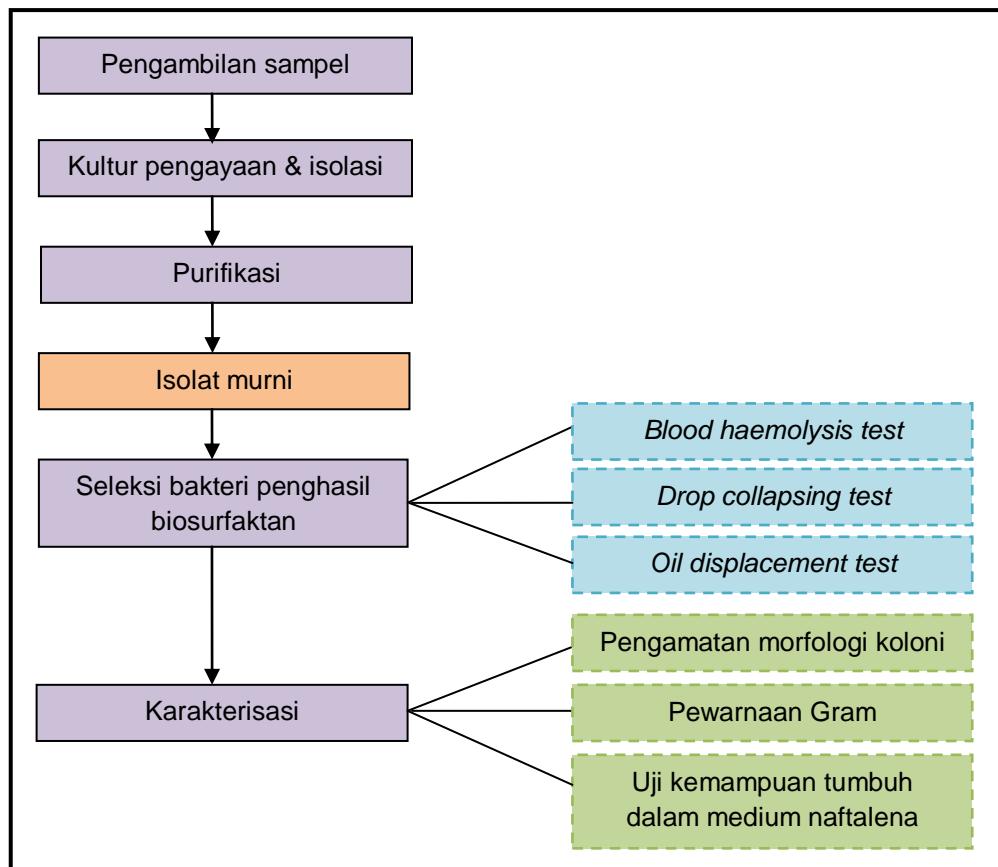
Sebanyak 200 mL larutan stok naftalena yang dilarutkan dalam aseton (konsentrasi 0,5 mg/mL) dimasukkan ke dalam gelas Beaker 250 mL (Ceyhan, 2011). Setelah itu, 0,5 mL larutan stok naftalena dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi medium MSM steril yang bervolume 4,5 mL untuk mendapatkan konsentrasi naftalena 50 ppm.

- Uji kemampuan tumbuh pada medium naftalena

Uji dilakukan untuk mengetahui kemampuan degradasi naftalena secara kualitatif dengan mengamati adanya pertumbuhan koloni. Sebanyak 1 mL kultur cair bakteri dari medium MSM + 1% minyak mentah dipindahkan ke dalam medium MSM cair + naftalena, kemudian diinkubasi dalam *rotary shaker* 100 rpm pada suhu ruang selama 5 hari. Metode uji kemampuan tumbuh dilakukan berdasarkan metode Kumar *et al.* (2006b). Sebanyak 100 μ L kultur cair bakteri dipindahkan ke dalam medium MSM padat dengan metode cawan sebar (*spread plate method*). Kristal naftalena sebanyak 1 g disebar secara merata pada tutup cawan petri steril, dan medium yang telah diinokulasi tadi diletakkan secara terbalik di atas tutup cawan petri yang telah berisi kristal naftalena (Gambar 6). Celah pada cawan petri dirapatkan dengan *plastic wrap*. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 30°C. Pertumbuhan bakteri diamati setiap hari selama 1 bulan.



Gambar 6. Uji kemampuan tumbuh pada medium naftalena dengan teknik sublimasi kristal naftalena.



Gambar 7. Prosedur penelitian.

i. Pembuatan Stock Culture

Isolat bakteri yang mampu menghasilkan biosurfaktan disimpan sebagai *stock culture* dalam larutan gliserol 30%. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasi ke dalam medium NB (*Nutrient Broth*), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Setelah diinkubasi, sebanyak 500 µL kultur bakteri dimasukkan ke dalam 500 µL gliserol 60% dalam tabung cryo, kemudian tabung ditutup dan dikocok pelan agar larutan tercampur. Selanjutnya, kultur bakteri disimpan dalam *deep freezer* bersuhu -20°C (Swaathy *et al.*, 2014).

E. Teknik Pengumpulan Data

Data yang diperoleh berupa hasil positif atau negatif (kualitatif) dari uji *blood haemolysis test*, *drop collapsing test*, dan *oil displacement test* yang dilakukan terhadap isolat. Pengamatan secara makroskopis dan pewarnaan Gram dilakukan untuk memperoleh data morfologi koloni dan tipe Gram dari isolat bakteri. Data potensi isolat dalam mendegradasi hidrokarbon naftalena diperoleh dari hasil uji dengan teknik sublimasi.

F. Teknik Analisis Data

Hasil penelitian disusun dalam bentuk tabel dan berupa data kualitatif. Seluruh data yang diperoleh kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan pustaka yang sesuai.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Isolat Bakteri dari Tanah Tercemar Hidrokarbon

Sampel tanah diambil dari dua lokasi berbeda, yaitu di tepi Kali Rawa Malang yang bermuara ke Teluk Jakarta, dan di pelabuhan kapal nelayan di wilayah Cilincing (Lampiran 2). Perbedaan lokasi pengambilan sampel ini bertujuan agar jenis bakteri yang didapat pada tahap isolasi menjadi lebih banyak dan bervariasi. Hal yang sama juga mendasari digunakannya dua jenis sumber karbon berbeda pada tahap isolasi, yaitu minyak mentah dan oli bekas. Minyak mentah dan oli bekas memiliki perbedaan komposisi hidrokarbon, sehingga memungkinkan didapatkannya jenis bakteri yang lebih beragam.

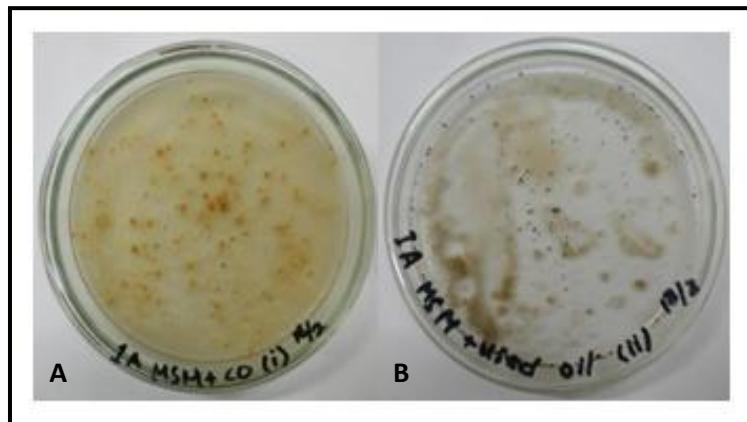
Minyak mentah tersusun atas senyawa hidrokarbon, senyawa non-hidrokarbon, senyawa organometal, dan garam anorganik (Matar dan Hatch, 2000). Senyawa hidrokarbon dalam minyak mentah terdiri dari 15-60% alkana (*paraffin*), 30-60%, sikloalkana (*naphthene*), 3-30% senyawa aromatik, dan *asphaltic* (Helmenstine, 2014). Sedangkan oli atau minyak pelumas tersusun atas *base oil* yang mengandung 30-70% sikloalkana dan 2% senyawa aromatik, serta 0,01-5% *friction modifier* (Dasai, 1991).

Sebelum melakukan isolasi, sampel tanah dimasukkan ke dalam medium pengayaan terlebih dahulu. Hal ini bertujuan agar bakteri yang diinginkan tumbuh dengan baik dan mengalami peningkatan jumlah sel

sehingga mudah diisolasi. Menurut Gilmore (2014), tahap pengayaan bertujuan untuk memberikan kondisi pertumbuhan yang sangat menguntungkan bagi organisme yang diinginkan, dan memberikan kondisi yang tidak menguntungkan bagi organisme kompetitor.

Tahap pengayaan ini dilakukan dalam medium MSM + minyak mentah dan MSM + oli bekas. *Mineral Salt Medium* (MSM) hanya mengandung garam-garam mineral, sehingga minyak mentah dan oli bekas merupakan satu-satunya sumber karbon yang tersedia. Organisme yang tidak memiliki toleransi terhadap hidrokarbon minyak bumi akan mati atau tidak dapat berkembang dengan baik, sedangkan organisme yang diinginkan akan berkembang lebih cepat sehingga mengalami peningkatan jumlah sel. Tahap kultur pengayaan dilakukan dengan agitasi agar kondisi aerasi dan nutrisi di dalam medium merata selama masa inkubasi.

Isolasi bakteri penghasil biosurfaktan dilakukan dengan metode cawan tuang (*pour plate method*). Metode ini memungkinkan bakteri untuk tumbuh di dalam agar maupun di permukaan agar (Talaro, 2009). Melalui metode ini, bakteri yang bersifat aerob, mikroaerofilik, maupun anaerob dapat tumbuh dalam media. Berdasarkan hasil yang diperoleh, semua koloni bakteri yang diamati pada tahap ini tumbuh di permukaan media, mengelilingi lapisan minyak mentah maupun oli bekas yang terkumpul di permukaan agar (Gambar 8). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang didapatkan pada tahap isolasi bersifat aerob dan anaerob fakultatif.



Gambar 8. Pertumbuhan koloni dalam medium MSM + minyak mentah (A) dan medium MSM + oli bekas (B).

Isolasi terhadap empat sampel tanah tercemar hidrokarbon dari dua lokasi berbeda menghasilkan 64 isolat bakteri. Sampel di lokasi I (tepi Kali Rawa Malang) menghasilkan 14 isolat bakteri yang tumbuh dalam medium MSM + minyak mentah, dan 16 isolat bakteri yang tumbuh dalam medium MSM + oli bekas. Sedangkan sampel di lokasi II (pelabuhan kapal nelayan, Cilincing) menghasilkan 16 isolat bakteri yang tumbuh dalam medium MSM + minyak mentah, dan 18 isolat bakteri yang tumbuh dalam medium MSM + oli bekas.

Jumlah bakteri yang didapat dari medium MSM + oli bekas pada kedua lokasi pengambilan sampel (lokasi I = 16; lokasi II = 18) lebih banyak dibanding jumlah bakteri dari medium MSM + minyak mentah (lokasi I = 14; lokasi II = 16). Jika dilihat dari komponen penyusunnya, oli bekas tersusun atas hidrokarbon yang lebih kompleks dibanding minyak mentah. Menurut Leahy dan Colwell (1990), jumlah dan proporsi mikroorganisme di lingkungan meningkat setelah terpapar polutan

hidrokarbon dan jumlah mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon umumnya mencerminkan tingkat kontaminasi ekosistem. Selain itu, Okerentugba dan Ezeronye (2003) menyatakan bahwa komunitas mikroorganisme yang teradaptasi memiliki proporsi yang lebih besar dari mikroorganisme yang dapat merespon polutan hidrokarbon. Dengan demikian, jumlah bakteri yang lebih banyak pada medium MSM + oli bekas mungkin disebabkan karena polutan yang mencemari tanah tempat sampel berasal memang didominasi oleh senyawa yang kompleks, sehingga lebih banyak bakteri yang mengembangkan kemampuan untuk beradaptasi pada lingkungan tersebut. Sampel tanah dalam penelitian ini diambil dari kawasan Teluk Jakarta. Berdasarkan pemantauan oleh BPLHD DKI Jakarta (2013), 9 dari 13 sungai yang bermuara ke Teluk Jakarta membawa limbah pembuangan sampah, industri, maupun rumah tangga yang menyebabkan perairan Teluk Jakarta menerima beban pencemaran yang cukup berat.

Berdasarkan kecepatan pertumbuhan, bakteri pada medium MSM agar + minyak mentah tumbuh lebih cepat dibandingkan dengan bakteri pada medium MSM agar + oli bekas. Hal ini mungkin disebabkan karena perbedaan komposisi penyusun kedua jenis minyak. Mengacu pada Helmenstine (2014) dan Dasai (1991), minyak mentah memiliki kandungan senyawa hidrokarbon sederhana (alkana) yang lebih tinggi dibandingkan dengan oli bekas. Dengan demikian, hidrokarbon dalam minyak mentah lebih mudah digunakan dibandingkan dengan hidrokarbon

dalam oli bekas. Studi biodegradasi hidrokarbon yang dilakukan oleh Leahy dan Cowell (1990) menunjukkan hierarki kemudahan tingkat degradasi di mana n-alkana > alkana bercabang > aromatik dengan berat molekul rendah > sikloalkana. Selain itu, Cong (2008) menyatakan bahwa cabang alkil menghambat penyerapan hidrokarbon ke dalam sel atau cabang alkil tersebut tidak rentan terhadap enzim dari jalur β -oksidasi. Dengan demikian, minyak mentah dapat lebih mudah digunakan oleh bakteri dibandingkan oli bekas, sehingga bakteri tumbuh lebih cepat.

Tabel 2. Morfologi koloni bakteri yang diisolasi dari lokasi I dan II.

Morfologi Koloni	Warna Koloni (n*=64)						Bentuk Koloni (n=64)		Tepi Koloni (n=64)			Elevasi Koloni (n=64)		Letak pada Medium (n=64)
	Putih	Putih susu	Krem	Kecoklatan	Coklat	Coklat kekuningan	Bundar	Tidak beraturan	Licin	Berlekuk	Tidak rata	Cembung	Datar	Permukaan
Lokasi I	6	5	6	7	6	-	13	17	6	18	6	21	9	30
Lokasi II	8	8	5	8	4	1	15	19	10	21	3	24	10	34
Jumlah	14	13	11	15	10	1	28	36	16	39	9	45	19	64

*n = jumlah total isolat

Morfologi koloni yang didapat pada tahap isolasi ditunjukkan dalam Tabel 2. Koloni isolat bakteri yang didapat dari lokasi I dan II memiliki warna yang beragam, yaitu putih, putih susu, krem, kecoklatan, coklat, dan coklat kekuningan. Bentuk koloni bundar atau tidak beraturan, dengan tepian licin, berlekuk, atau tidak rata. Elevasi koloni sebagian besar cembung, dan sebagian kecil memiliki elevasi yang datar. Semua koloni

tumbuh pada permukaan medium. Rincian morfologi koloni dari 64 isolat dapat dilihat pada Lampiran 4.

2. Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

a. *Blood Haemolysis Test*

Hasil uji *blood haemolysis* terhadap 64 isolat menunjukkan bahwa sebanyak 32 isolat (50%) memiliki kemampuan hemolitik pada *blood agar*, dan 32 isolat (50%) lainnya tidak memiliki kemampuan hemolitik. Setiap isolat memiliki lebar zona bening yang berbeda. Zona bening yang kecil diberi skor '+', zona bening sedang diberi skor '++', dan zona bening besar diberi skor '+++' (Tabel 3). Shoeb *et al.* (2015) dalam penelitiannya mendapatkan 24% isolat memiliki kemampuan hemolitik dan 76% isolat tidak memiliki kemampuan hemolitik. Adanya kemampuan hemolitik mengindikasikan bahwa isolat bakteri tersebut merupakan bakteri penghasil biosurfaktan.

Tabel 3. Jumlah isolat positif dan negatif uji *blood haemolysis*.

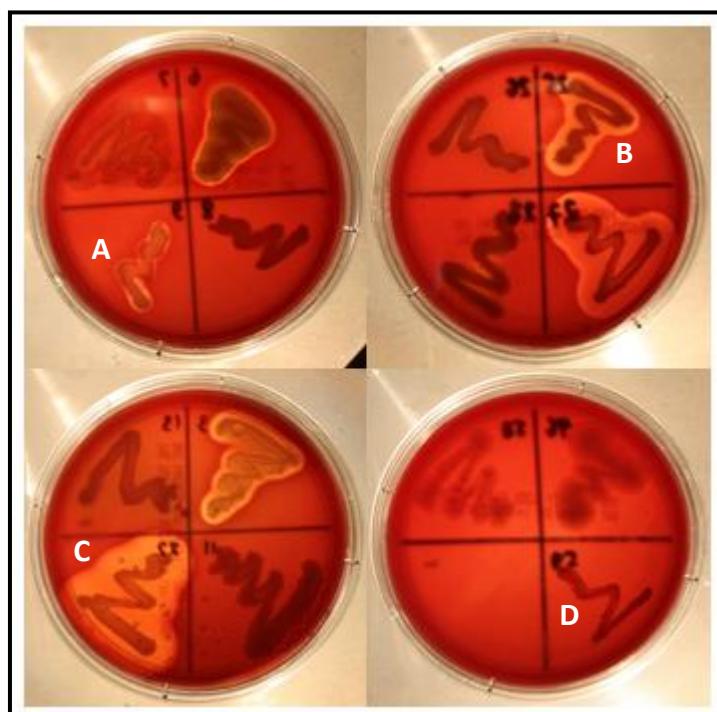
Hasil Uji <i>Blood Haemolysis</i>	Jumlah Isolat
Hasil positif	
+++	12
++	14
+	6
Hasil negatif	
-	32
Jumlah	64

Keterangan: +++ = zona besar; ++ = zona sedang;
+ = zona kecil; - = negatif.

Carillo *et al.* (1996) menemukan adanya hubungan antara aktivitas hemolitik dengan produksi biosurfaktan, dan merekomendasikan penggunaan metode *blood haemolysis* sebagai metode primer untuk menyeleksi aktivitas biosurfaktan serta untuk membatasi jumlah sampel yang akan diuji pada medium cair. Biosurfaktan dapat berinteraksi dengan membran sel darah merah dan menyebabkan kerusakan membran yang berujung pada lisis sel. Menurut Zaragoza *et al.* (2010), biosurfaktan mengubah permeabilitas membran sel darah merah dan menyebabkan pelepasan ion K⁺ yang relatif cepat. Setelah kebocoran ion K⁺, air masuk ke dalam sel akibat adanya gradien osmotik yang disebabkan oleh hemoglobin yang terperangkap di dalam sel. Hal tersebut menyebabkan sel darah merah membengkak, lisis, dan hemoglobin dilepaskan dari sel. Lisisnya sel darah merah di dalam *blood agar* oleh biosurfaktan menyebabkan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Timbulnya zona bening disebabkan karena biosurfaktan merusak membran sel, sehingga sel darah merah menjadi lisis dan hemoglobin keluar dari sel. Menurut Thavasi *et al.* (2011), mikroorganisme dengan kemampuan hemolitik diyakini sebagai penghasil biosurfaktan.

Lebar zona bening yang ditunjukkan oleh isolat dengan kemampuan hemolitik dalam penelitian ini berbeda-beda (Gambar 9). Perbedaan lebar zona bening kemungkinan disebabkan oleh perbedaan konsentrasi biosurfaktan yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Youssef *et al.* (2004) dalam penelitiannya mendapatkan bahwa terdapat hubungan yang linear

antara besar diameter zona bening dan konsentrasi surfaktin (biosurfaktan yang dihasilkan oleh genus *Bacillus*).



Gambar 9. Beberapa isolat bakteri yang memiliki kemampuan hemolitik (ditunjukkan oleh zona bening di sekitar goresan), dan isolat bakteri yang tidak memiliki kemampuan hemolitik. A = +; B = ++; C = +++; D = -.

Aktivitas hemolitik biosurfaktan dapat terjadi melalui dua mekanisme berbeda. Hemolisis dapat disebabkan oleh gangguan langsung pada membran melalui kelarutan membran, yang secara normal terjadi pada konsentrasi biosurfaktan yang tinggi. Hemolisis dapat juga disebabkan oleh meningkatnya permeabilitas membran terhadap zat terlarut

berukuran kecil, yang secara normal terjadi saat konsentrasi biosurfaktan rendah, sehingga menyebabkan lisis osmotik (Zaragoza *et al.*, 2010).

b. *Drop Collapsing Test*

Hasil uji *drop collapsing* dari supernatan ke-64 isolat dibandingkan dengan kontrol negatif berupa akuades. Diameter tetesan yang dibentuk oleh akuades (kontrol negatif) pada penelitian ini adalah 2,37 mm. Berdasarkan pengukuran diameter tetesan supernatan dengan bantuan program ImageJ, didapatkan hasil pengukuran seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4. Supernatan dari isolat bakteri yang menunjukkan diameter tetesan setidaknya 1 mm lebih besar dari kontrol negatif adalah isolat yang positif menghasilkan biosurfaktan (Thavasi *et al.*, 2011).

Hasil uji *drop collapsing* pada Tabel 4 menunjukkan 24 hasil positif (memiliki diameter $> 3,37$ mm) dan 40 hasil negatif (memiliki diameter $< 3,37$ mm). Penentuan hasil positif dan negatif dalam penelitian ini mengacu pada Thavasi *et al.* (2011), yang menyatakan bahwa hasil uji *drop collapsing* dinyatakan positif jika diameter tetesan setidaknya 1 mm lebih besar dari kontrol negatif berupa akuades. Hasil uji *drop collapsing* yang didapatkan oleh Thavasi *et al.* (2011) dalam penelitiannya adalah 82 hasil positif dan 23 hasil negatif.

Tabel 4. Hasil pengukuran diameter tetesan supernatan dari 64 isolat pada uji *drop collapsing*.

No.	Kode Isolat	Diameter Tetesan	No.	Kode Isolat	Diameter Tetesan
1.	1Bcu-8	2,84 mm	33.	1Buo-39	3,32 mm
2.	2Acu-19	2,84 mm	34.	2Auo-49	3,32 mm
3.	1Buo-40	2,84 mm	35.	2Auo-50	3,32 mm
4.	1Buo-42	2,84 mm	36.	2Auo-51	3,32 mm
5.	1Buo-44	2,84 mm	37.	2Buo-56	3,32 mm
6.	1Buo-45	2,84 mm	38.	2Buo-58	3,32 mm
7.	2Auo-53	2,84 mm	39.	2Buo-59	3,32 mm
8.	2Buo-62	2,84 mm	40.	2Buo-64	3,32 mm
9.	1Acu-1	3,08 mm	41.	2Acu-21	3,55 mm
10.	1Acu-2	3,08 mm	42.	2Bcu-24	3,55 mm
11.	1Acu-4	3,08 mm	43.	1Auo-33	3,55 mm
12.	1Bcu-12	3,08 mm	44.	1Auo-34	3,55 mm
13.	1Bcu-14	3,08 mm	45.	1Auo-38	3,55 mm
14.	2Acu-15	3,08 mm	46.	1Buo-43	3,55 mm
15.	1Auo-32	3,08 mm	47.	2Auo-52	3,55 mm
16.	1Auo-37	3,08 mm	48.	2Buo-60	3,55 mm
17.	1Buo-41	3,08 mm	49.	2Acu-22	3,60 mm
18.	1Buo-46	3,08 mm	50.	2Bcu-27	3,60 mm
19.	2Auo-47	3,08 mm	51.	2Bcu-28	3,60 mm
20.	2Auo-54	3,08 mm	52.	2Bcu-25	3,70 mm
21.	2Auo-55	3,08 mm	53.	1Acu-3	3,79 mm
22.	2Buo-57	3,08 mm	54.	1Acu-7	3,79 mm
23.	1Acu-6	3,32 mm	55.	2Acu-18	3,79 mm
24.	1Bcu-9	3,32 mm	56.	2Bcu-29	3,79 mm
25.	1Bcu-10	3,32 mm	57.	1Auo-35	3,79 mm
26.	1Bcu-11	3,32 mm	58.	2Buo-61	3,79 mm
27.	2Acu-16	3,32 mm	59.	2Bcu-30	4,00 mm
28.	2Acu-17	3,32 mm	60.	1Bcu-13	4,03 mm
29.	2Acu-20	3,32 mm	61.	1Auo-36	4,03 mm
30.	2Bcu-23	3,32 mm	62.	2Auo-48	4,03 mm
31.	2Bcu-26	3,32 mm	63.	1Acu-5	4,26 mm
32.	1Auo-31	3,32 mm	64.	2Buo-63	4,74 mm

Keterangan: Diameter kontrol (-) = 2,37 mm; hasil dinyatakan positif jika diameter tetesan > 1 mm dari diameter kontrol negatif (> 3,37 mm).

Isolat dengan kode 2Buo-63 memiliki diameter tetesan supernatan yang paling lebar di antara 64 isolat, yaitu 4,74 mm. Menurut Bodour dan Miller-Maier (1998), terdapat korelasi linear antara konsentrasi biosurfaktan dengan diameter tetesan pada metode *drop collapsing*. Konsentrasi biosurfaktan yang semakin tinggi akan menghasilkan

diameter yang semakin lebar. Selain itu, Bodour dan Miller-Maier juga menyatakan bahwa biosurfaktan dengan kemampuan yang tinggi hanya memerlukan konsentrasi yang sedikit untuk menyebabkan *drop collapse*. Dengan demikian, isolat 2Buo-63 mungkin menghasilkan konsentrasi biosurfaktan yang tinggi atau biosurfaktan yang dihasilkan mungkin memiliki kemampuan yang tinggi.



Gambar 10. Hasil uji *drop collapsing* dalam mikroplate (sumur 1A-10F). Sumur 12A adalah kontrol positif (Tween 20), dan sumur 12B adalah kontrol negatif (akuades).

Jain *et al.* (1991) merekomendasikan penggunaan metode *drop collapsing test* sebagai metode yang mudah dan sensitif untuk menguji produksi biosurfaktan. Metode *drop collapsing test* didasarkan pada kemampuan biosurfaktan untuk mengacaukan kestabilan tetesan cairan pada permukaan berminyak. Kemampuan ini berhubungan dengan tegangan permukaan. Menurut Bodour dan Miller-Maier (1998), jika tetesan supernatan mengandung biosurfaktan, kekuatan tegangan antar

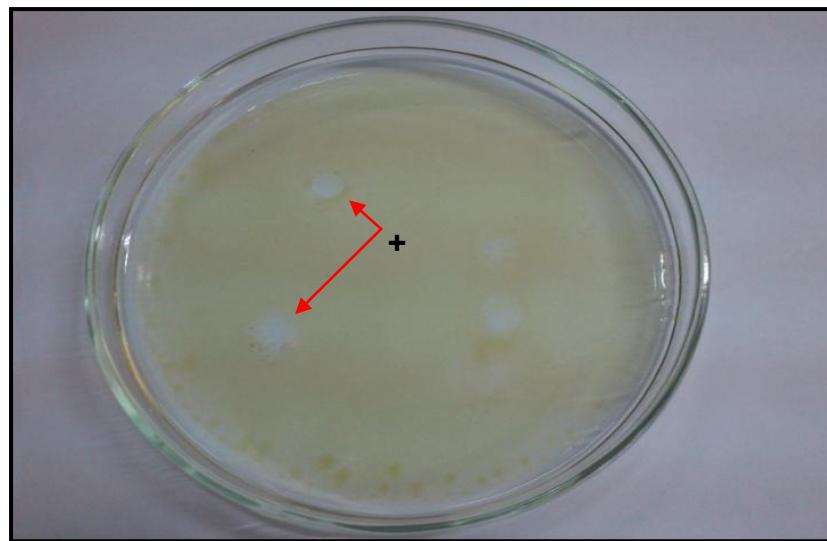
muka antara tetesan dan permukaan hidrofobik akan berkurang dan mengakibatkan bentuk tetesan menjadi datar di atas permukaan hidrofobik. Sebaliknya, tetesan supernatan yang tidak mengandung biosurfaktan akan berbentuk cembung karena molekul air yang polar ditolak dari permukaan hidrofobik.

c. *Oil Displacement Test*

Uji *oil displacement* yang dilakukan terhadap ke-64 isolat menunjukkan hasil positif pada 46 isolat, dan hasil negatif pada 18 isolat. Hasil dinyatakan positif jika supernatan yang diteteskan ke atas lapisan minyak mentah di atas akuades pecah dan menyebabkan zona bening pada pengamatan selama 30 detik (Jaysree *et al.*, 2011). Joshi dan Shekhawat (2014) dalam penelitiannya mendapatkan 52 isolat yang menunjukkan zona bening pada uji *oil displacement*. Terbentuknya zona bening mengindikasikan bahwa dalam supernatan yang diteteskan terdapat kandungan biosurfaktan.

Menurut Thavasi *et al.* (2011), tetesan supernatan yang mengandung biosurfaktan akan menimbulkan zona bening pada lapisan minyak. Zona bening ini diakibatkan oleh kandungan biosurfaktan dalam supernatan yang mengusir minyak dari lokasi tetesan, namun mekanismenya masih belum dipahami dengan baik. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Morikawa *et al.* (2000), bahwa mekanisme perpindahan minyak oleh

surfaktan belum dijelaskan pada tingkat molekul, namun metode ini mudah dilakukan dan memberikan hasil yang sensitif.



Gambar 11. Hasil positif uji *oil displacement* ditunjukkan oleh zona bening pada lapisan minyak (tanda panah merah). Terbentuknya zona bening mengindikasikan adanya kandungan biosurfaktan dalam supernatan.

Metode *oil displacement test* atau *oil spreading assay* dikembangkan oleh Morikawa *et al.* (1993). Metode ini didasarkan pada kemampuan biosurfaktan untuk mengubah sudut kontak pada antar muka minyak dengan air. Youssef *et al.* (2004) menyatakan bahwa diameter zona bening yang dibentuk oleh aktivitas biosurfaktan bertambah seiring dengan peningkatan konsentrasi biosurfaktan yang diuji. Dengan demikian, metode *oil displacement test* ini juga dapat digunakan untuk pengukuran kuantitatif biosurfaktan.

3. Penentuan Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Hasil dari ketiga metode seleksi bakteri penghasil biosurfaktan digabungkan untuk menentukan isolat bakteri yang menghasilkan biosurfaktan. Rekapitulasi data hasil uji *blood haemolysis*, *drop collapsing*, dan *oil displacement* ditunjukkan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Rekapitulasi data hasil uji *blood haemolysis*, *drop collapsing*, dan *oil displacement* dari ke-64 isolat.

Metode Seleksi			Jumlah	Percentase
BHT	DCT	ODT		
+++	+	+	6	9,37%
++	+	+	8	12,50%
+	+	+	3	4,69%
-	+	+	6	9,37%
+++	-	+	3	4,69%
++	-	+	3	4,69%
+	-	+	3	4,69%
+++	-	-	3	4,69%
++	-	-	3	4,69%
-	-	+	14	21,87%
-	+	-	1	1,56%
-	-	-	11	17,19%
Jumlah Total Isolat			64	100%

Keterangan: BHT = *blood haemolysis test*, DCT = *drop collapsing test*, ODT = *oil displacement test*; + = hasil positif, - = hasil negatif; BHT + = zona kecil, BHT ++ = zona sedang, BHT +++ = zona besar.

Terdapat dua kriteria isolat yang ditetapkan sebagai isolat penghasil biosurfaktan dalam penelitian ini. Kriteria yang pertama adalah isolat yang menunjukkan hasil positif pada ketiga uji (uji *blood haemolysis*, uji *drop*

collapsing, dan uji *oil displacement*), dan kriteria yang kedua adalah isolat yang positif pada uji *drop collapsing* dan *uji oil displacement*. Berdasarkan rekapitulasi data dalam Tabel 5, terdapat 17 isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif pada ketiga uji, dan 6 isolat yang positif pada uji *drop collapsing* dan *uji oil displacement*. Isolat yang positif pada uji *drop collapsing* dan *oil displacement* tetapi negatif pada uji *blood haemolysis* juga ditetapkan sebagai isolat penghasil biosurfaktan karena adanya kemungkinan biosurfaktan yang dihasilkan tidak mampu berdifusi dengan baik dalam *blood agar*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Youssef *et al.* (2004) bahwa biosurfaktan yang memiliki kemampuan difusi yang buruk tidak dapat melisiskan sel darah merah. Dengan demikian, total isolat penghasil biosurfaktan yang didapatkan dalam penelitian ini adalah sebanyak 23 isolat. Sembilan isolat berasal dari sampel di lokasi I, dan 14 isolat berasal dari sampel di lokasi II (Lampiran 5).

Penggunaan tiga metode seleksi yang berbeda bertujuan untuk memastikan bahwa isolat yang didapat benar-benar mampu menghasilkan biosurfaktan. Menurut Walter *et al.* (2010), biosurfaktan merupakan kelompok biomolekul yang memiliki struktur sangat beragam, seperti glikolipid, lipopeptida, lipoprotein, lipopolisakarida, atau fosfolipid. Oleh karena itu, kebanyakan metode seleksi mikroorganisme penghasil biosurfaktan didasarkan pada efek fisik surfaktan. Menurut Satpute *et al.* (2008), penggunaan satu metode seleksi saja tidak dapat digunakan untuk

mengidentifikasi semua jenis biosurfaktan. Dengan demikian, kombinasi dari beberapa metode dibutuhkan untuk hasil seleksi yang efektif.

Isolat yang menunjukkan hasil positif pada uji *blood haemolysis* dan uji *oil displacement* tidak ditetapkan sebagai isolat penghasil biosurfaktan karena adanya kemungkinan bahwa aktivitas hemolitik disebabkan oleh senyawa lain. Menurut Youssef *et al.* (2004), faktor virulensi yang dihasilkan oleh mikroorganisme juga dapat melisiskan sel darah merah dalam agar. Selain itu, isolat yang menunjukkan hasil positif hanya pada satu uji juga tidak ditentukan sebagai isolat penghasil biosurfaktan.

4. Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

a. Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel

Isolat bakteri yang dinyatakan sebagai penghasil biosurfaktan adalah isolat dengan hasil positif pada ketiga uji (uji *blood haemolysis*, uji *drop collapsing*, dan uji *oil displacement*), dan isolat dengan hasil positif pada uji *drop collapsing* dan uji *oil displacement* (Tabel 5). Dengan kriteria tersebut, didapatkan 23 isolat bakteri yang merupakan bakteri penghasil biosurfaktan. Satu di antara isolat tersebut merupakan bakteri Gram positif, sedangkan 22 isolat lainnya merupakan bakteri Gram negatif. Bentuk sel yang teramati dari semua isolat tersebut adalah kokus, basil, dan kokobasil. Morfologi koloni dan morfologi sel bakteri penghasil biosurfaktan dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Tabel 6. Morfologi koloni bakteri penghasil biosurfaktan.

Morfologi Koloni	Warna Koloni (n*=23)				Bentuk Koloni (n=23)		Tepi Koloni (n=23)				Elevasi Koloni (n=23)		
	Putih	Krem	Kuning muda	Kuning	Bundar	Tidak beraturan	Licin	Berombak	Berkarang	Tidak beraturan	Cembung	Timbul	Datar
Jumlah	5	9	5	4	22	1	20	1	1	1	3	9	11

*n = jumlah total isolat

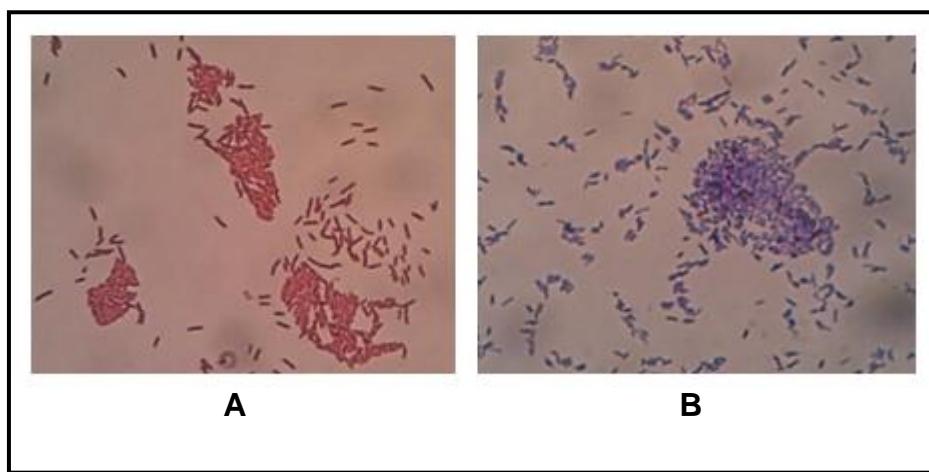
Tabel 7. Morfologi sel bakteri penghasil biosurfaktan.

Morfologi Sel	Bentuk Sel (n*=23)			Tipe Gram (n=23)	
	Kokus	Kokobasil	Basil	Gram negatif	Gram positif
Jumlah	9	2	12	22	1

*n = jumlah total isolat

Hasil dalam penelitian ini sesuai dengan hasil dari berbagai penelitian sebelumnya yang mendapatkan bahwa bakteri penghasil biosurfaktan lebih didominasi oleh jenis bakteri Gram negatif, seperti *Pseudomonas aeruginosa* (Selvi dan Nithya, 2014; Saravanan dan Vijayakumar, 2012), *Stenotrophomonas maltophilia* (Belcher et al., 2012), *Myroides* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Acinetobacter anitratus* (Maneerat dan Phetrong, 2007), *Gluconobacter* sp. (Dhail dan Jasuja, 2012), *Acinetobacter* sp. (Hamzah et al., 2013), *Klebsiella* sp. (Sneha et al., 2012), dan *Alcanivorax dieselolei* (Qiao dan Shao, 2009). Sedangkan

bakteri Gram positif yang diketahui dapat menghasilkan biosurfaktan adalah *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., dan *Staphylococcus aureus* (Tabatabaei et al., 2005; Dhail dan Jasuja, 2012; Sneha et al., 2012). Bakteri penghasil biosurfaktan yang berhasil diisolasi memiliki bentuk sel dan morfologi koloni yang beragam (Lampiran 6). Hal ini menunjukkan bahwa jenis bakteri penghasil biosurfaktan tersebut berbeda-beda, walaupun belum diidentifikasi secara biokimia maupun molekuler.



Gambar 12. Isolat 2Auo-48 (A): Gram negatif, basil; dan isolat 2Buo-61 (B): Gram positif, basil.

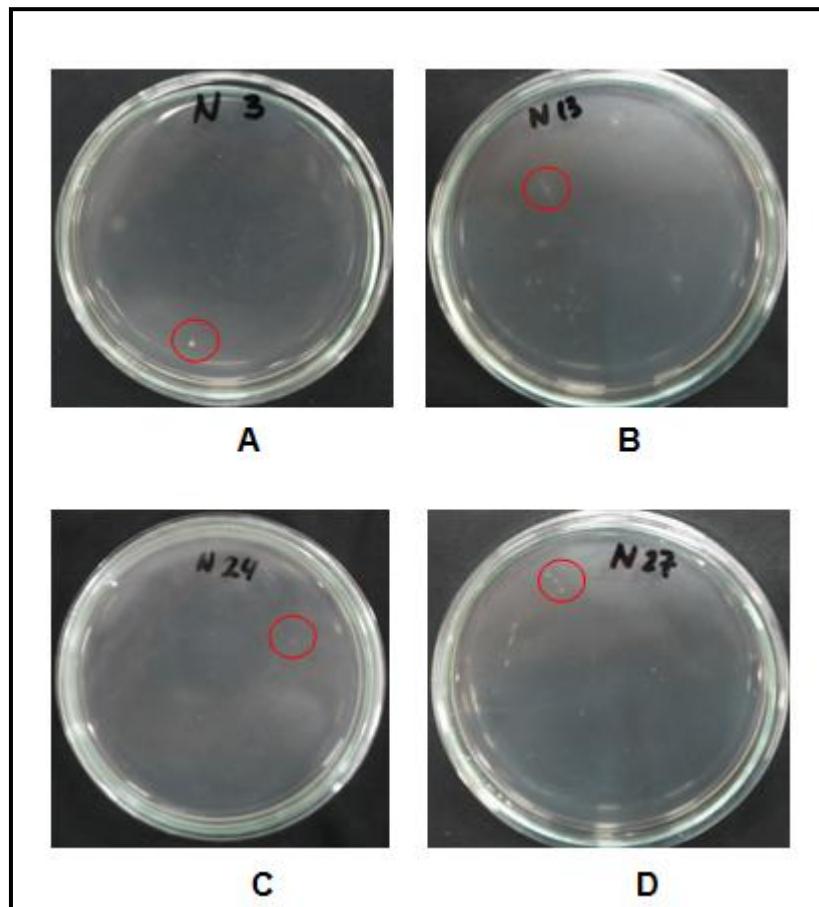
Bakteri penghasil biosurfaktan pada penelitian ini bersifat aerob jika dilihat dari pertumbuhannya pada tahap isolasi, yaitu semua bakteri tumbuh pada permukaan medium. Hal ini sesuai dengan pernyataan dalam Kshirsagar et al. (2013) bahwa biosurfaktan umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme aerob yang menggunakan karbohidrat, hidrokarbon, dan minyak nabati atau hewani sebagai sumber karbon. Beberapa bakteri pendegradasi minyak menghasilkan biosurfaktan ekstraseluler (Bouchez

et al., 1999). Biosurfaktan dalam hal ini digunakan untuk memfasilitasi penyerapan dan degradasi minyak oleh mikroorganisme dengan cara mengemulsi substrat hidrokarbon.

b. Uji Kemampuan Tumbuh pada Medium Naftalena

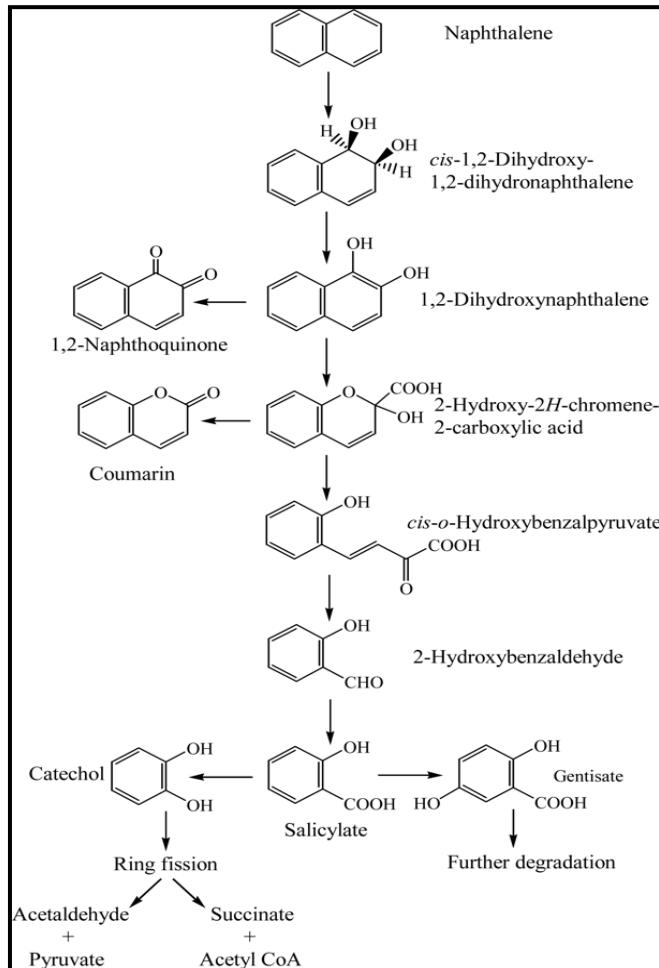
Isolat bakteri penghasil biosurfaktan yang didapat ditumbuhkan pada medium MSM agar yang diberi kristal naftalena untuk dilihat kemampuannya dalam mendegradasi naftalena. Isolat bakteri yang mampu tumbuh pada medium MSM agar + naftalena adalah sebanyak empat isolat. Isolat tersebut adalah isolat dengan kode 1Acu-3, 1Bcu-13, 2Bcu-24, dan 2Bcu-27 (Gambar 13). Adanya pertumbuhan ditandai dengan kemunculan koloni pada medium MSM + naftalena. Berdasarkan Othman *et al.* (2010), kemampuan mendegradasi ditunjukkan oleh adanya zona bening di sekeliling koloni pada medium yang mengandung PAH sebagai satu-satunya sumber karbon.

Dalam penelitian ini tidak teramati adanya zona bening di sekeliling koloni. Hal ini mungkin disebabkan karena lapisan naftalena yang menempel pada medium terlalu tipis sehingga zona bening tidak terlihat. Menurut Um *et al.* (2010), koloni yang tumbuh tanpa zona bening di sekelilingnya kemungkinan besar adalah bakteri pendegradasi naftalena karena naftalena yang disediakan dapat dimanfaatkan oleh bakteri tersebut.



Gambar 13. Isolat 1Acu-3 (A), 1Bcu-13 (B), 2Bcu-24 (C), dan 2Bcu-27 (D) yang tumbuh dalam medium MSM agar + naftalena.

Biodegradasi naftalena oleh bakteri diawali dengan penggabungan kedua atom molekul oksigen ke dalam molekul aromatik untuk membentuk cis-1,2-dihidroksi-1,2-dihidronaftalena. Kemudian cis-1,2-dihidroksi-1,2-dihidronaftalena dikonversikan menjadi 1,2-dihidroksinaftalena. Tahap selanjutnya adalah pemecahan secara enzimatik 1,2-dihidroksinaftalena menjadi cis-2-hidroksibenzalpiruvat, yang kemudian diubah oleh serangkaian dioksigenase menjadi salisilat dan piruvat. Salisilat teroksidasi oleh salisilat hidrosilase menjadi katekol (Mrozik *et al.*, 2003).



Gambar 14. Jalur katabolik naftalena oleh bakteri (Seo et al., 2009).

Isolat 1Acu-3, 1Bcu-13, 2Bcu-24, dan 2Bcu-27 merupakan bakteri Gram negatif. Menurut Mrozik *et al.* (2003), bakteri pendegradasi naftalena umumnya merupakan bakteri Gram negatif, dan sebagian besar berasal dari genus *Pseudomonas*. Nigam *et al.* (1998) menyatakan bahwa degradasi naftalena oleh bakteri Gram negatif dan Gram positif berbeda secara biokimia. Pada bakteri Gram negatif (terutama genus *Pseudomonas*), salisilat mengalami dekarboksilasi oksidatif untuk menghasilkan katekol sebelum metabolisme selanjutnya. Sedangkan

pada bakteri Gram positif seperti *Rhodococcus* sp., salisilat dihidroksilasi menjadi gentisat.

Biosurfaktan diketahui dapat meningkatkan degradasi hidrokarbon dengan cara mengemulsi substrat hidrokarbon sehingga lebih mudah digunakan oleh sel bakteri. Menurut Cipinyte *et al.* (2011), isolat bakteri penghasil biosurfaktan yang sekaligus mampu mendegradasi PAH dapat diterapkan dalam bioremediasi pada lokasi yang terkontaminasi hidrokarbon minyak bumi. Hal ini dapat menjadi solusi ramah lingkungan untuk mengatasi pencemaran minyak di laut dan pesisir.

BAB V

KESIMPULAN, IMPLIKASI, DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Dua puluh tiga isolat bakteri yang diperoleh dari sampel tanah di kawasan Teluk Jakarta memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa biosurfaktan. Satu di antaranya merupakan bakteri Gram positif, sedangkan 22 lainnya merupakan bakteri Gram negatif.
2. Empat isolat di antaranya juga memiliki kemampuan mendegradasi naftalena, yaitu isolat 1Acu-3, 1Bcu-13, 2Bcu-24, dan 2Bcu-27. Keempat isolat merupakan bakteri Gram negatif.

B. Implikasi

Implikasi dari penelitian ini adalah ke-23 isolat yang menunjukkan kemampuan menghasilkan biosurfaktan memungkinkan untuk dikembangkan lebih lanjut dalam aplikasi bioremediasi setelah dilakukan berbagai pengujian dan studi tambahan.

C. Saran

Saran dari penelitian ini adalah:

1. Teknik seleksi bakteri penghasil biosurfaktan yang digunakan sebaiknya ditambahkan dengan uji kuantitatif agar kemampuan dan efektivitas biosurfaktan dapat diketahui dengan baik.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai jenis biosurfaktan yang dihasilkan, analisis kuantitatif biosurfaktan, dan kurva pertumbuhan terhadap isolat yang didapatkan. Hal tersebut perlu dilakukan agar waktu optimum produksi biosurfaktan dari setiap isolat dapat diketahui.
3. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut terhadap isolat yang didapat dengan pengujian biokimia dan identifikasi molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, F. 2012. Kandungan senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) di Teluk Jakarta. *Ilmu Kelautan*, **17** (4): 199-208.
- Anandaraj, J., dan Thivakaran, P. 2010. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *Journal of Bioscience and Technology*, **1** (3): 120-126.
- Angaleswari, C., Suji, L., dan Mahalingam, P.U. 2012. Potentials of biosurfactant producing *Pseudomonas* sp. from automobile workshop. *Advances in Applied Science Research*, **3** (6): 4030-4032.
- Aparna, A., Srinikethan, G., Hedge, S. 2012. Isolation, screening, and production of biosurfactant by *Bacillus clausii* 5 B. *Research in Biotechnology*, **3** (2): 49-56.
- Belcher, R.W., Huynh, K.V., Hoang, T.V., dan Crowley, D.E. 2012. Isolation of biosurfactant-producing bacteria from tha Rancho La Brea Tar Pits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**: 3261-3267.
- Benson, Harold J. 2001. *Microbiological Applications Laboratory Manual, Eight Edition*. The McGraw-Hill Companies Inc., New York: xi + 478 hlm.
- Bodour, A.A. dan Miller-Maier, R.M. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **32**: 273-280.
- Bouchez, N.M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., dan Vandecasteele, J.P. 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, **86**: 421-428.
- BPLHD DKI Jakarta. 2013. Pemantauan Kualitas Air Laut di Teluk Jakarta Tahun 2012: 1 hlm. http://bplhd.jakarta.go.id/masterpage.php?id_berita1=83, 30 November 2014, pk. 23:15 WIB.
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., dan González-López, J. 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Science of the Total Environment*, **407**: 3634-3640.

- Carillo, P.G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S.J., dan Giulietti, A.M. 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12**: 82-84.
- Ceyhan, N. 2011. Biodegradation of pyrene by newly isolated *Proteus vulgaris*. *Scientific Research and Essays*, **7** (1): 66-77.
- Cipinyte, V., Grigiskis, S., Sapokaite, D., dan Baskys, E. 2011. Production of biosurfactants by Arthrobacter sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Environment Technology Resources*, **1**: 68-75.
- Cong, L.T.N. 2008. *Degradation of Branched Chain Aliphatic and Aromatic Petroleum Hydrocarbons by Microorganism*. Disertasi. Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Dipublikasikan: 149 hlm.
- Dasai, M. 1991. Lubricating oil composition. *United States Patent*, 5.064.546.
- Dhail, S. dan Jasuja, N.D. 2012. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. *African Journal of Environmental Science and Technology*, **6** (6): 263-266.
- Donlon, D.L. dan Bauder, J.W. 2011. A General Essay on Bioremediation of Contaminated Soil: 1 hlm. <http://waterquality.montana.edu/docs/methane/Donlan.shtml>, 25 September 2014, pk. 9:59 WIB.
- Environmental Protection Agency Terms of Environment Dictionary. 2008. Definition of bioremediation: 1 hlm. <http://www.ecologydictionary.org/KpNVW/Environmental-Engineering-Dictionary/Bioremediation>, 26 Oktober 2014, pk. 9:35 WIB.
- Fakruddin. 2012. Biosurfactant: Production and Application. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, **3** (4): 1-5.
- Fatimah. 2007. Uji produksi biosurfaktan oleh *Pseudomonas* sp. pada substrat yang berbeda. *Berkas Penelitian Hayati*, **12**: 181-185.
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., dan Banat, I.M. 2010. (Bio)surfactant and bioremediation, successes and failures. *Research Signpost*, **37/661** (2): 145-156.
- Gilmore, David F. 2014. Enrichment Culture: 1 hlm. http://www.clt.astate.edu/dgilmore/Research%20students/enrichment_culture.htm, 29 Agustus 2014, pk. 11:14 WIB.

- Grace, L.P., Chang, T.C., Whang, L., Kao, C., Pan, T., dan Cheng, S. 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **65**: 1119-1127.
- Hamzah, A., Sabturani, N., dan Radiman, S. 2013. Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria. *Sains Malaysiana*, **42** (25): 615-623.
- Helmenstine, A.M. 2014. Chemical Composition of Petroleum: 1 hlm. <http://chemistry.about.com/od/geochemistry/a/Chemical-Composition-Of-Petroleum.htm>, 29 Agustus 2014, pk. 14:24 WIB.
- Heul, R.M. 2009. *Environmental Degradation of Petroleum Hydrocarbons*. Utrecht University, Netherlands: 53 hlm.
- Ivanković, T. dan Hrenović, J. 2010. Surfactants in the environment. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, **61**: 95-110.
- Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., dan Trevors, J.T. 1991. A drop-collapse test for screening surfactant producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **13**: 271-279.
- Jaysree, R.C., Basu, S., Singh, P.P., Ghosal, T., Patra, P.A., Keerthi, Y., dan Rajendran, N. 2011. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental sample. *Pharmacologyonline*, **3**: 1427-1433.
- Jia, C. dan Batterman, S. 2010. A critical review of naphthalene sources and exposures relevant to indoor and outdoor air. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **7**: 2903-2939.
- Joshi, P.A., dan Shekhawat, D.B. 2014. Screening and isolation of biosurfactant producing bacteria from petroleum contaminated soil. *European Journal of Experimental Biology*, **4** (4): 164-169.
- Kaloorazi, N.A. dan Choobari, M.F. 2013. Biosurfactants: properties and application. *Journal of Biology and Today's World*, **2** (5): 235-241.
- Kshirsagar, S.V., Manwar, A.V., dan Awasthi, R.S. 2013. Screening of biosurfactant producing bacteria from Lonar Soda lake of India. *Bionano Frontier*, **6** (2): 197-201.
- Kumar, M., Leon, V., Materano, A.S., dan Ilzins, O.A. 2006a. Enhancement of oil degrading by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, **55** (2): 139-146.

- Kumar, M., Leon, V., Materano, A.S., Ilzins, O.A., Galindo-Castro, I., dan Fuenmayor, S.L. 2006b. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. IR1. *Z. Zeitschrift für Naturforschung, 61c*: 203-212.
- Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid and Interface Science, 7*: 12-20.
- Leahy, J.G. dan Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews, 54* (3): 305-315.
- Maneerat, S. dan Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 29* (3): 781-791.
- Matar, S. dan Hatch, L.F. 2000. *Chemistry of Petrochemical Processes, Second Edition*. Gulf Publishing Company, Texas: xvi + 392 hlm.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., dan Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology, 175* (20): 6459-6466.
- Morikawa, M., Hirata, Y., dan Imanaka, T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactant. *Biochimica et Biophysica Acta, 1488*: 211-218.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., dan Labuzek, S. 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Polish Journal of Environmental Studies, 12* (1): 15-25.
- Mulligan, C.N. dan Gibbs, B.F. 2004. Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings of the Indian National Science Academy, 1*: 31-55.
- Nguyen, T.T., Youssef, N.H., McInerney, M.J., dan Sabatini, D.A. 2008. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research, 42*: 1735-1743.
- Nigam, P., Banat, I.M., dan Marchant, R. 1998. Degradation of naphthalene by bacterial cultures. *Environment International, 24*: 671-677.
- Nitschke, M. dan Costa, S.G. 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology, 18*: 252-259.

- Okerentugba, P.O. dan Ezeronyeu, O.U. 2003. Petroleum degrading potentials of single and mixed cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, **2** (9): 288-292.
- Othman, N., Hussain, N., dan Abdul-Talib, S. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by pure strain isolated from municipal sludge: synergistic and cometabolism phenomena. *International Conference on Environment*, **1**: 1-14.
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., dan Cameotra, S.S. 2011. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**: 633-654.
- Plaza, G.A., Zjawiony, I., dan Banat, I.M. 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **50**: 71-77.
- Preuss, R., Angerer, J., dan Drexler, H. 2003. Naphthalene – an environmental and occupational toxicant. *International Archives Occupational and Environmental Health*, **76**: 556-576.
- Qiao, N. dan Shao, Z. 2009. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Journal of Applied Microbiology*, **108**: 1207-1216.
- Rodrigues, L., I.M. Banat, J. Teixeira, R. Oliveira. 2006. Biosurfactants: potential application in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**: 609-618.
- Romero-Zeron, L. 2012. *Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites*. InTech., Canada: 318 hlm.
- Saharan, B.S., Sahu, R.K., dan Sharma, D. 2011. A Review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, **29**: 1-14.
- Sahoo, K. 2009. *Analysis of Catabolic Gene in Marine Bacteria for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation*. Disertasi. National Institute of Technology Rourkela. Dipublikasikan: 58 hlm.

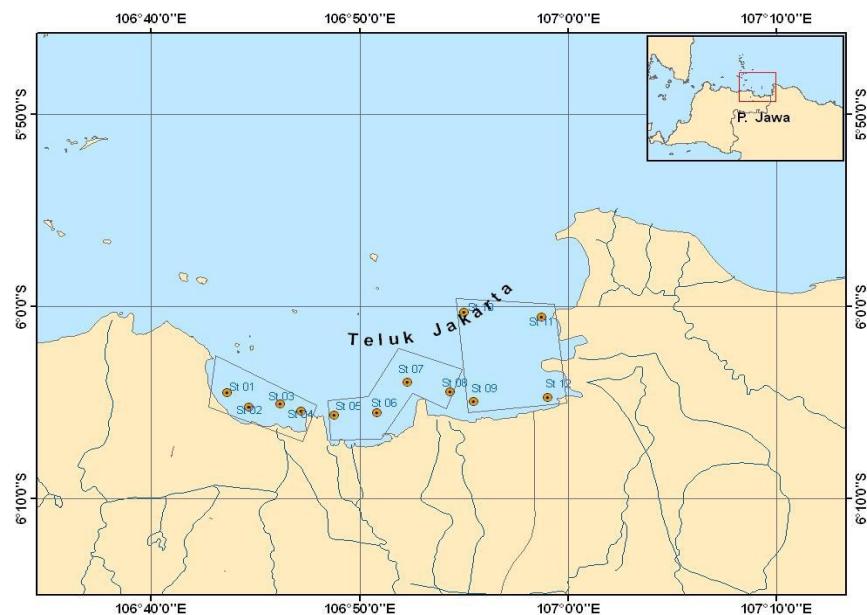
- Saimmai, A., Kaewrueng, J., dan Maneerat, S. 2012. Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil. *Annals of Microbiology*, **10**: 1-11.
- Salihu, A., Abdulkadir, I., dan Almustapha, M.N. 2009. An investigation for potential development on biosurfactants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **3** (5): 111 – 117.
- Sanket G., K. dan Yagnik, B.N. 2013. Current trend and potential for microbial biosurfactant. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, **4** (1): 1-8.
- Saravanan, V. dan Vijayakumar, S. 2012. Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *Journal of Academia and Industrial Research*, **1** (5): 264-268.
- Satpute, S.K., Bhawsar, B.D., Dhakephalkar, P.K., dan Chopade, B.A. 2008. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*, **37** (3): 243-250.
- Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephlarkar, P.K., Banat, I.M., dan Chopade, B.A. 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **2010**: 1-18.
- Selvi, K.V. dan Nithya, N. 2014. Production and biodegradation potentials of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from oil polluted water samples. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, **1**(1): 149-161.
- Seo, J., Keum, Y., dan Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **6**: 278-309.
- Shoeb, E., Badar, U., Akhter, J., Ansari, F.A., Waqar, M., dan Ansari N.A. 2012. Screening of surfactant producing bacterial strains isolated from soil samples of an automobile workshop. *Karachi University Journal of Science*, **40**: 31-36.
- Shoeb, E., Ahmed, N., Akhter, J., Badar, U., Siddiqui, K., Ansari, F.A., Waqar, M., Imtiaz, S., Akhtar, N., Shaiks, Q.A., Baig, R., Butt, S., Khan, S., Khan, S., Hussain, S., Ahmed, B., dan Ansari, M.A. 2015. Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. *Turkish Journal of Biology*, **39**: 1-7.

- Sneha, K.S., Padmapriya, B., dan Rajeswari, T. 2012. Isolation and screening of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* from oil spilled soils. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, **3** (2): 321-325.
- Soberón-Chávez, G. dan Maier, R.M. 2011. Biosurfactants: a general overview. *Microbiology Monographs*, **20**: 1-11.
- Swaathy, S., Kavitha, V., Pravin, A.S., Sekaran, G., Mandal, A.B., dan Gnanamani, A. 2014. Phylogenetic framework and biosurfactant gene expression analysis of marine *Bacillus* spp. of eastern coastal plain of Tamil Nadu. *International Journal of Bacteriology*, **2014**: 1-10.
- Tabatabaei, A., Mazaheri, A.M., Noohi, A.A, dan Sajadian, V.A. 2005. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoir. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, **2** (1): 6-12.
- Talaro, Kathleen P. 2009. *Foundations in Microbiology: Basic Principles, Seventh Edition*. The McGraw-Hill Companies Inc., New York: xvi + 597 hlm.
- Thavasi, R., Sharma, S., dan Jayalakshmi, S. 2011. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, **S1** (001): 1-6.
- Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., dan Petrov, P. 2005. Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, **60c**: 577-582.
- Um, Y., Chang, M.W., dan Holoman, T.P. 2010. A simple and effective plating method to screen polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria under various redox conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **88**: 291-297.
- Urum, K. dan Pekdemir, T. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*, **57**: 1139-1150.
- Wakefield, J.C. 2007. Naphthalene. *Health Protection Agency*, **1**: 1-25.
- Wang, Q., Zhang, S., Li, Y., dan Klassen, W. 2011. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. *Journal of Environmental Protection*, **2**: 47-55.

- Walter, V., Syldatk, C., dan Hausmann, R. 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **672**: 1-13.
- Whang, L.M., Liu, P.W.G., Ma, C.C., dan Cheng, S.S. 2008. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, **151**: 155-163.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., dan McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **56**: 339-347.
- Zaragoza, A., Aranda, F.J., Espuny, M.J., Teruel, J.A., Marques, A., Manresa, A., dan Ortiz, A. 2010. Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence of colloid-osmotic mechanism. *Langmuir*, **26** (11): 8567-8572.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pencemaran oleh PAH di Teluk Jakarta



Lokasi pengambilan sampel air dan sedimen di Teluk Jakarta (Ahmad, 2012).

Tabel Kadar total PAH (ppb) dalam air laut di Teluk Jakarta pada bulan Maret 2011 (Ahmad, 2012).

Wilayah Sekitar Muara					
Stasiun	Barat	Stasiun	Tengah	Stasiun	Timur
1	377,99	5	104,61	9	112,91
2	474,68	6	337,07	10	138,71
3	201,57	7	169,78	11	370,79
4	350,52	8	214,17	12	184,32
Minimum	201,57	Minimum	104,61	Minimum	112,91
Maksimum	474,68	Maksimum	337,07	Maksimum	370,79

Lampiran 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel



Lokasi pengambilan sampel tanah di Cilincing, Jakarta Utara.

Lokasi I = pelabuhan kapal nelayan, lokasi II = Kali Rawa Malang (<https://www.google.co.id>).

Lampiran 3. Pembuatan Medium

1. MSM (*Mineral Salt Medium*)

Mineral Salt Medium dibuat dengan komposisi Na_2HPO_4 (6 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L), NH_4Cl (1 g/L), NaCl (1 g/L), MgSO_4 1 M (1 ml/L), dan *trace element* (2,5 ml/L). Setelah dicampur dengan akuades sebanyak 1 liter, medium MSM diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1,5 jam. Medium kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2. NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 20 g bubuk NA dicampur dengan 1 liter akuades dalam Erlenmeyer. Medium NA kemudian dimasak hingga mendidih sambil terus diaduk menggunakan batang pengaduk. Medium NA yang telah jadi kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3. NB (*Nutrient Broth*)

Sebanyak 8 g bubuk NB dicampur dengan 1 liter akuades dalam Erlenmeyer. Medium NB kemudian dimasak hingga mendidih sambil terus diaduk menggunakan batang pengaduk. Medium NB yang telah jadi kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Lampiran 4.

Tabel Morfologi Koloni yang Diisolasi dari Sampel Tanah Tercemar Hidrokarbon

No.	Sumber	Kode Isolat	Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi	Letak pada Medium
1	1A MSM + minyak mentah	1Acu-1	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
2		1Acu-2	Bundar	Licin	Krem	Cembung	Permukaan
3		1Acu-3	Bundar	Licin	Krem	Datar	Permukaan
4		1Acu-4	Tidak beraturan	Berlekuk	Krem	Datar	Permukaan
5		1Acu-5	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
6		1Acu-6	Bundar	Licin	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
7		1Acu-7	Tidak beraturan	Berlekuk	Krem	Cembung	Permukaan
8	1B MSM + minyak mentah	1Bcu-8	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Datar	Permukaan
9		1Bcu-9	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih	Datar	Permukaan
10		1Bcu-10	Bundar	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan
11		1Bcu-11	Tidak beraturan	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan
12		1Bcu-12	Tidak beraturan	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan
13		1Bcu-13	Bundar	Berlekuk	Krem	Cembung	Permukaan
14		1Bcu-14	Bundar	Licin	Coklat	Cembung	Permukaan
15	2A MSM + minyak mentah	2Acu-15	Tidak beraturan	Berlekuk	Krem	Datar	Permukaan
16		2Acu-16	Tidak beraturan	Berlekuk	Krem	Datar	Permukaan
17		2Acu-17	Bundar	Berlekuk	Coklat kekuningan	Cembung	Permukaan
18		2Acu-18	Bundar	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan
19		2Acu-19	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Datar	Permukaan

Lampiran 4. (Lanjutan)

No.	Sumber	Kode Isolat	Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi	Letak pada Medium
20	2A MSM + minyak mentah	2Acu-20	Bundar	Licin	Krem	Cembung	Permukaan
21		2Acu-21	Bundar	Berlekuk	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
22		2Acu-22	Bundar	Berlekuk	Krem	Cembung	Permukaan
23	2B MSM + minyak mentah	2Bcu-23	Bundar	Licin	Krem	Cembung	Permukaan
24		2Bcu-24	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Datar	Permukaan
25		2Bcu-25	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
26		2Bcu-26	Tidak beraturan	Licin	Putih susu	Cembung	Permukaan
27		2Bcu-27	Tidak beraturan	Licin	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
28		2Bcu-28	Bundar	Licin	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
29		2Bcu-29	Bundar	Licin	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
30		2Bcu-30	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
31	1A MSM + oli bekas	1Auo-31	Bundar	Tidak rata	Putih susu	Datar	Permukaan
32		1Auo-32	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
33		1Auo-33	Bundar	Tidak rata	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
34		1Auo-34	Bundar	Licin	Coklat	Cembung	Permukaan
35		1Auo-35	Tidak beraturan	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan
36		1Auo-36	Bundar	Tidak rata	Putih	Cembung	Permukaan
37		1Auo-37	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih	Cembung	Permukaan
38		1Auo-38	Bundar	Licin	Putih	Cembung	Permukaan
39	1B MSM + oli bekas	1Buo-39	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih susu	Datar	Permukaan
40		1Buo-40	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih susu	Datar	Permukaan
41		1Buo-41	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih susu	Cembung	Permukaan
42		1Buo-42	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih susu	Cembung	Permukaan

Lampiran 4. (Lanjutan)

No.	Sumber	Kode Isolat	Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi	Letak pada Medium
43	1B MSM + oli bekas	1Buo-43	Tidak beraturan	Tidak rata	Putih	Cembung	Permukaan
44		1Buo-44	Bundar	Tidak rata	Krem	Datar	Permukaan
45		1Buo-45	Tidak beraturan	Berlekuk	Kecoklatan	Cembung	Permukaan
46		1Buo-46	Bundar	Tidak rata	Putih	Datar	Permukaan
47	2A MSM + oli bekas	2Auo-47	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih	Cembung	Permukaan
48		2Auo-48	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih susu	Datar	Permukaan
49		2Auo-49	Bundar	Licin	Putih susu	Cembung	Permukaan
50		2Auo-50	Bundar	Licin	Putih	Cembung	Permukaan
51		2Auo-51	Bundar	Licin	Putih susu	Cembung	Permukaan
52		2Auo-52	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih susu	Datar	Permukaan
53		2Auo-53	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih susu	Cembung	Permukaan
54		2Auo-54	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih	Datar	Permukaan
55		2Auo-55	Bundar	Licin	Putih susu	Cembung	Permukaan
56	2B MSM + oli bekas	2Buo-56	Tidak beraturan	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan
57		2Buo-57	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih	Cembung	Permukaan
58		2Buo-58	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih	Datar	Permukaan
59		2Buo-59	Tidak beraturan	Berlekuk	Putih	Datar	Permukaan
60		2Buo-60	Bundar	Tidak rata	Putih susu	Datar	Permukaan
61		2Buo-61	Bundar	Tidak rata	Putih	Cembung	Permukaan
62		2Buo-62	Tidak beraturan	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan
63		2Buo-63	Bundar	Tidak rata	Putih	Cembung	Permukaan
64		2Buo-64	Tidak beraturan	Berlekuk	Coklat	Cembung	Permukaan

Lampiran 5.

Tabel Data Rekapitulasi Hasil Uji *Blood Haemolysis*, *Drop Collapsing*, dan *Oil Displacement* dari ke-64 Isolat.

No.	Kode Isolat	<i>Blood Haemolysis Test</i>	<i>Drop Collapsing Test</i>	<i>Oil Displacement Test</i>
1.	2Acu-18	+++	+	+
2.	2Acu-21	+++	+	+
3.	2Acu-22	+++	+	+
4.	2Bcu-27	+++	+	+
5.	2Auo-48	+++	+	+
6.	2Buo-61	+++	+	+
7.	1Acu-3	++	+	+
8.	1Acu-5	++	+	+
9.	2Bcu-25	++	+	+
10.	2Bcu-30	++	+	+
11.	1Auo-35	++	+	+
12.	1Auo-36	++	+	+
13.	1Auo-38	++	+	+
14.	2Auo-52	++	+	+
15.	2Bcu-28	+	+	+
16.	2Buo-60	+	+	+
17.	2Buo-63	+	+	+
18.	1Acu-7	-	+	+
19.	1Bcu-13	-	+	+
20.	2Bcu-24	-	+	+
21.	2Bcu-29	-	+	+
22.	1Auo-34	-	+	+
23.	1Buo-43	-	+	+
24.	2Bcu-23	+++	-	+
25.	2Auo-49	+++	-	+
26.	2Auo-51	+++	-	+
27.	1Acu-2	++	-	+
28.	1Acu-4	++	-	+
29.	2Acu-15	++	-	+
30.	1Bcu-9	+	-	+
31.	1Auo-32	+	-	+
32.	2Buo-64	+	-	+
33.	1Acu-1	+++	-	-
34.	2Auo-54	+++	-	-
35.	2Buo-57	+++	-	-
36.	1Acu-6	++	-	-
37.	2Acu-16	++	-	-
38.	2Auo-50	++	-	-
39.	1Bcu-10	-	-	+
40.	1Bcu-14	-	-	+

Lampiran 5. (Lanjutan)

No.	Kode Isolat	<i>Blood Haemolysis Test</i>	<i>Drop Collapsing Test</i>	<i>Oil Displacement Test</i>
41.	2Acu-17	-	-	+
42.	2Acu-20	-	-	+
43.	2Bcu-26	-	-	+
44.	1Auo-31	-	-	+
45.	1Auo-37	-	-	+
46.	1Buo-39	-	-	+
47.	1Buo-40	-	-	+
48.	1Buo-45	-	-	+
49.	1Buo-46	-	-	+
50.	2Buo-56	-	-	+
51.	2Buo-58	-	-	+
52.	2Buo-62	-	-	+
53.	1Auo-33	-	+	-
54.	1Bcu-8	-	-	-
55.	1Bcu-11	-	-	-
56.	1Bcu-12	-	-	-
57.	2Acu-19	-	-	-
58.	1Buo-41	-	-	-
59.	1Buo-42	-	-	-
60.	1Buo-44	-	-	-
61.	2Auo-47	-	-	-
62.	2Auo-53	-	-	-
63.	2Auo-55	-	-	-
64.	2Buo-59	-	-	-

Keterangan: + = hasil positif, - = hasil negatif; *Blood Haemolysis Test* + = zona kecil,
Blood Haemolysis Test ++ = zona sedang, *Blood Haemolysis Test* +++ = zona besar.

Lampiran 6. Tabel Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Kode Isolat	Morfologi Koloni				Morfologi Sel		Degradasi Naftalena
	Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi	Bentuk Sel	Tipe Gram	
1Acu-3	Bundar	Licin	Kuning	Cembung	Kokus	(-)	+
1Acu-5	Bundar	Licin	Putih	Timbul	Kokobasil	(-)	
1Acu-7	Bundar	Licin	Krem	Timbul	Basil	(-)	
1Bcu-13	Bundar	Berombak	Krem	Datar	Kokus	(-)	+
2Acu-18	Bundar	Licin	Kuning	Timbul	Basil	(-)	
2Acu-21	Bundar	Licin	Krem	Datar	Basil	(-)	
2Acu-22	Bundar	Licin	Putih	Cembung	Kokus	(-)	
2Bcu-24	Bundar	Licin	Krem	Datar	Basil	(-)	+
2Bcu-25	Bundar	Licin	Krem	Datar	Basil	(-)	
2Bcu-27	Bundar	Licin	Kuning muda	Datar	Basil	(-)	+
2Bcu-28	Bundar	Licin	Kuning muda	Timbul	Basil	(-)	
2Bcu-29	Bundar	Licin	Kuning muda	Timbul	Kokobasil	(-)	
2Bcu-30	Bundar	Licin	Kuning muda	Datar	Basil	(-)	
1Auo-34	Bundar	Licin	Krem	Datar	Kokus	(-)	
1Auo-35	Bundar	Licin	Krem	Cembung	Kokus	(-)	
1Auo-36	Bundar	Berkarang	Krem	Timbul	Kokus	(-)	
1Auo-38	Bundar	Licin	Putih	Datar	Kokus	(-)	
1Buo-43	Bundar	Licin	Putih	Timbul	Basil	(-)	
2Auo-48	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Kuning	Datar	Basil	(-)	
2Auo-52	Bundar	Licin	Krem	Timbul	Kokus	(-)	
2Buo-60	Bundar	Licin	Putih	Datar	Basil	(-)	
2Buo-61	Bundar	Licin	Kuning muda	Timbul	Basil	(+)	
2Buo-63	Bundar	Licin	Kuning	Datar	Kokus	(-)	

Keterangan: (-) = bakteri Gram negatif, (+) = bakteri Gram positif; + = mampu mendegradasi naftalena.

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Nurlaila Khairunnisa
No. Registrasi : 3425101474
Jurusan : Biologi
Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "**Isolasi, Seleksi, dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Lokasi Tercemar Hidrokarbon di Kawasan Teluk Jakarta**" adalah:

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil percobaan pada bulan Februari–Juli 2014.
2. Bukan merupakan duplikasi skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya ini tidak benar.

Jakarta, Januari 2015
Yang membuat pernyataan,



Nurlaila Khairunnisa

RIWAYAT HIDUP



NURLAILA KHAIRUNNISA. Dilahirkan di Jakarta pada tanggal 17 April 1992. Anak ke 3 dari 3 bersaudara dari pasangan Bapak M. Marchum dan Ibu Sujiyani. Penulis memulai pendidikan di TKIT Nurmala Hikmah (1996-1998), SDN 04 Pondok Kelapa (1998-2004), SMPN 109 Jakarta Timur (2004-2007), SMAN 71 Jakarta Timur (2007-2010). Pada tahun yang sama diterima di Jurusan Biologi, Universitas Negeri Jakarta melalui jalur UMB (Ujian Masuk Bersama).

Selama masa perkuliahan, penulis telah mengikuti rangkaian kegiatan seperti Pendidikan Dasar Fotografi tahun 2010, Cakrawala Biologi (CABI), Studi Ilmiah Biologi (SIMBOL), Pelantikan Anggota Baru Kelompok Studi CMC (*Conservation of Marine Acropora*), dan mengikuti Kuliah Kerja Lapangan (KKL) di Cagar Alam Batu Kahu, Bali pada tahun 2013. Penulis berkesempatan melakukan Praktek Kerja Lapang (PKL) bidang Mikrobiologi di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Jakarta pada bulan Juli-Agustus 2013 dengan judul penelitian “Analisis Kualitas Air Minum Berdasarkan APM Coliform dan *Escherichia coli*”.

Penulis terdaftar sebagai anggota kelompok studi CMC Acropora sejak tahun 2012, dan merupakan salah satu penerima beasiswa Nagao Environmental Foundation pada semester 095-101. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Mikrobiologi pada semester ganjil dan genap tahun 2013-2014.