



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI DEGRADASI ALKANA OLEH BAKTERI LAUT INDONESIA
CULTURE COLLECTION (InaCC) DARI PULAU PARI KEPULAUAN
SERIBU DENGAN METODE KROMATOGRAFI GAS**

SKRIPSI

**ARCHIETTA NIIGATA PUTRI
1106012842**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
OKTOBER 2015**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI DEGRADASI ALKANA OLEH BAKTERI LAUT INDONESIAIAN
CULTURE COLLECTION (InaCC) DARI PULAU PARI KEPULAUAN
SERIBU DENGAN METODE KROMATOGRAFI GAS**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ARCHIETTA NIIGATA PUTRI
1106012842**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
OKTOBER 2015**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Archietta Niigata Putri

NPM : 1106012842

Tanda Tangan : 

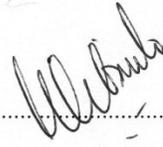
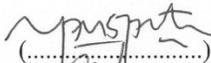
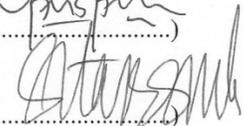
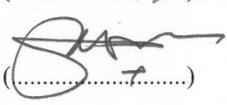
Tanggal :

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Archietta Niigata Putri
NPM : 1106012842
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Uji Degradasi Alkana oleh Bakteri Laut Indonesian
Culture Collection (InaCC) dari Pulau Pari
Kepulauan Seribu dengan Metode
Kromatografi Gas

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima
sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan
Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia**

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc	(..... )
Pembimbing II	: Dr. Puspita Lisdiyanti, M. Agr. Chem	(..... )
Penguji I	: Dra. Sitaresmi Ismangil, M.Sc	(..... )
Penguji II	: Dr. rer. nat. Yasman, M.Sc	(..... )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 20 Oktober 2015

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil‘aalamiin, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta skripsi dengan judul “Uji Degradasi Alkana oleh Bakteri Laut Indonesian Culture Collection (InaCC) dari Pulau Pari Kepulauan Seribu dengan Metode Kromatografi Gas”. Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih setinggi-tingginya kepada seluruh pihak yang telah memberi dukungan dan bimbingan selama menjalani penelitian dan penulisan tugas akhir:

1. Dr. Puspita Lisdiyanti M.Agr.Chem dan Dr Wibowo Mangunwardoyo M.Sc, selaku pembimbing atas seluruh nasihat, saran, arahan atau bimbingan serta kesabaran kepada penulis selama menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi.
2. Dra. Sitaresmi Ismangil M.Sc selaku penguji I dan Dr. rer. nat. Yasman M.Sc selaku penguji II sekaligus Ketua Departemen Biologi yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan maupun penulisan skripsi.
3. Dr. Dra. Nisyawati M.S. sebagai pembimbing akademik, atas segala perhatian, nasihat, serta motivasinya untuk penulis.
4. Seluruh staf pengajar Departemen Biologi UI, atas segala ilmu dan bimbingannya selama penulis menjalani kuliah.
5. Kedua orang tua, Herman Niigata dan Titiek Handayani serta adik, Biothania Niigata Putri yang selalu memberi semangat, dukungan, doa, dan motivasi yang tidak ada hentinya kepada penulis.
6. Mba Rinatu Siswi, S.Si., Ibu Ariani, M.Si., Mba Diajeng Aliya, M.Si, Mas Muhammad Nur Ruwandani, S.Si., Pak Dian, S.Si, Mba Miranti Nurindah, S.Si., Ibu Mia, Mba Repanata, Cornelius Widjaya selaku rekan kerja penelitian dan semua staff peneliti atas kesabarannya dalam membantu, mendampingi, membimbing serta berbagi ilmu selama penulis melakukan penelitian di Pusat Penelitian Biologi *Indonesian Culture Collection* Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (InaCC – LIPI) .

7. Bapak Parjono selaku staff Laboratorium Kimia Pusat Laboratorium Forensik Kepolisian Republik Indonesia (PUSLABFOR POLRI) atas bantuannya dalam keperluan analisis GC/MS.
8. Ka Mariana, M.Si dan Uni Vilia, M. Si atas bantuannya dalam proses konstruksi pohon filogeni.
9. Sahabat seperjuangan Andi Aisyiah Alwie sekaligus rekan kerja penelitian, Corry Oktaviani Sutejo, Nabilla Rastania, Widya Setyaningtyas, dan Muchamad Aditya Rachmanto yang selalu setia dalam memberikan dukungan, hiburan, motivasi, semangat kepada penulis selama menjalani penelitian dan kuliah di Biologi UI.
10. Serta seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Akhir kata, penulis memohon maaf apabila masih terdapat banyak kesalahan dalam penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Depok, Oktober 2015

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Archietta Niigata Putri
NPM : 1106012842
Program Studi : Sarjana
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Uji Degradasi Alkana oleh Bakteri Laut Indonesian Culture Collection (InaCC) dari Pulau Pari Kepulauan Seribu dengan Metode Kromatografi Gas.

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada Tanggal : Oktober 2015
Yang menyatakan



(Archietta Niigata Putri)

ABSTRAK

Nama : Archietta Niigata Putri
Program Studi : Biologi
Judul : Uji Degradasi Alkana oleh Bakteri Laut Indonesian Culture Collection (InaCC) dari Pulau Pari Kepulauan Seribu dengan Metode Kromatografi Gas

Alkana merupakan komponen senyawa hidrokarbon terbesar sebanyak 60% penyusun utama minyak bumi. Isolat bakteri potensial pendegradasi alkana telah diisolasi dari daerah perairan tercemar tumpahan minyak di Pulau Pari. Penelitian bertujuan untuk memperoleh isolat dengan kemampuan tinggi mendegradasi alkana. Pengukuran pertumbuhan isolat bakteri dilakukan pada λ 600 nm dan analisis degradasi alkana dengan metode GC/MS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 15 isolat yang diuji pertumbuhannya dengan menggunakan *paraffin oil* terdapat 2 isolat mewakili dua tipe kurva pertumbuhan yaitu isolat 97 kelompok I dengan pertumbuhan K(+) rendah ($OD < 0,1$ pada hari ke-12) dan isolat 19 kelompok II dengan pertumbuhan K(+) tinggi ($OD \geq 0,5$ pada hari ke-12). Analisis degradasi alkana menunjukkan penurunan luas area pada isolat 97 dengan kemampuan degradasi *docosane* ($C_{22}H_{46}$) paling tinggi sebesar 96,04% dan isolat 19 dengan kemampuan degradasi *hexadecane* ($C_{16}H_{34}$) paling tinggi sebesar 61,37%. Identifikasi molekuler menggunakan 16S rRNA menunjukkan isolat 97 sebagai *Pseudoalteromonas lypolitica* dan isolat 19 sebagai *Vibrio alginolyticus*.

Kata Kunci : analisis GC/MS, bakteri laut, degradasi alkana, 16S rRNA

xii + 66 halaman : 27 gambar; 3 tabel; 7 lampiran
Daftar Acuan : 95 (1981--2015)

ABSTRACT

Name : Archietta Niigata Putri
Study Program : Biology
Title : Alkane Degradation of Indonesian Culture Collection (InaCC)
Marine Bacteria Isolated From Pari Island Kepulauan Seribu
with Gas Chromatography Method

Alkane is the largest hydrocarbon component of petroleum (60%). Potential alkane degrading bacteria have been isolated from oil contaminated waters at Pari Island. The study aims to obtain isolate with high capability of alkane degradation. The measurement of bacterial growth was performed at λ 600 nm and analysis of the alkane degradation with GC/MS method. Isolate 97 and 19 were selected out of 15 isolates with the highest growth represent the two groups of curve growth. Isolate 97 belong to group I with the low growth of $K (+)$ OD < 0.1 on day 12 and isolate 19 belong to group II with the high growth of $K (+)$ ≥ 0.5 OD at day 12. The alkane degradation analysis showed isolate 97 had the highest decrease of *docosane* ($C_{22}H_{46}$) up to 96.04% and isolates 19 had the highest decrease of *hexadecane* ($C_{16}H_{34}$) up to 61.37%. The results of molecular identification using 16S rRNA indicate that isolate 97 and 19 were *Pseudoalteromonas lypolitica* and *Vibrio alginolyticus* respectively.

Keywords : alkane degradation, GC/MS analysis, marine bacteria, 16S rRNA

xii + 66 pages : 27 pictures; 3 tables; 7 appendixes

Bibliography : 95 (1981--2015)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Minyak Bumi	5
2.2 Bioremediasi Cemaran Minyak.....	6
2.3 Senyawa Hidrokarbon Alkana	8
2.4 Bakteri	10
2.5 Bakteri Pendegradasi Minyak	11
2.6 Pertumbuhan Bakteri.....	12
2.7 Kromatografi Gas.....	14
3. METODOLOGI PENELITIAN	16
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	16
3.2 Alat, Bahan, dan Cara Kerja.....	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan	16
3.2.2.1 Mikroorganisme	16
3.2.2.2 Medium.....	17
3.2.2.3 Bahan Kimia	17
3.3 Cara Kerja.....	17
3.3.1 Pembuatan Medium.....	17
3.3.1.1 <i>Marine Agar</i> (MA)	17
3.3.1.2 <i>Marine Broth</i> (MB)	18
3.3.2 Pembuatan <i>Stock</i> dan <i>Working Culture</i>	18
3.3.3 Uji Pertumbuhan Isolat Bakteri Pendegradasi Alkana	18
3.3.4 Ekstraksi Senyawa Hidrokarbon	19
3.3.5 Analisis Senyawa Alkana	19
3.3.6 Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri.....	20
3.3.7 Analisis dan Penyajian Data	21
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Pengukuran Pertumbuhan Bakteri	22

4.2 Derajat Keasaman (pH)	31
4.3 Analisis Kemampuan Degradasi Alkana	32
4.4 Identifikasi Molekuler Isolat Potensial Pendegradasi Alkana.....	40
4.4.1 Isolasi dan Amplifikasi DNA Isolat 97 dan 19.....	40
4.4.2 Hasil Sekuensing DNA dan Analisis Identifikasi Isolat 97 dan19 Berdasarkan Gen 16S rRNA.....	41
5. KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran	47
DAFTAR ACUAN.....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur kimia senyawa hidrokarbon alifatik dan aromatik.	6
Gambar 2.3.(1)	Titik didih oktana dan isomernya	8
Gambar 2.3.(2)	Jalur degradasi alkana gugus C terminal & subterminal.....	9
Gambar 2.6.	Kurva pertumbuhan bakteri.....	13
Gambar 4.1.(1)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 39	23
Gambar 4.1.(2)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 56	23
Gambar 4.1.(3)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 66	23
Gambar 4.1.(4)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 97	24
Gambar 4.1.(5)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 100	24
Gambar 4.1.(6)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 38	24
Gambar 4.1.(7)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 19	26
Gambar 4.1.(8)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 37	27
Gambar 4.1.(9)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 40	27
Gambar 4.1.(10)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 41	27
Gambar 4.1.(11)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 50	28
Gambar 4.1.(12)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 60	28
Gambar 4.1.(13)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 61	28
Gambar 4.1.(14)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 70	29
Gambar 4.1.(15)	Kurva pertumbuhan isolat pada medium <i>marine broth</i> dan <i>Paraffin Oil</i> isolat 95	29
Gambar 4.3.(1)	Kromatogram kontrol hari ke-0.....	34
Gambar 4.3.(2)	Kromatogram isolat 97 hari ke-5	34
Gambar 4.3.(3)	Kromatogram isolat 97 hari ke-9	35
Gambar 4.3.(4)	Kromatogram isolat 19 hari ke-5	37
Gambar 4.3.(5)	Kromatogram isolat 19 hari ke-9	37
Gambar 4.4.(1)	Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA	41
Gambar 4.4.2.(1)	Pohon filogenetik isolat 97	42
Gambar 4.4.2.(2)	Pohon filogenetik isolat 19	44

DAFTAR TABEL

Tabel 4.2	Perubahan pH pada medium uji alkana selama masa inkubasi 12 hari	31
Tabel 4.3.(1)	Penurunan Luas Area Senyawa Alkana Hasil GC/MS isolat 97 hari ke-5 dan 9.....	35
Tabel 4.3.(2)	Penurunan Luas Area Senyawa Alkana Hasil GC/MS isolat 19 hari ke-5 dan 9.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema kerja penelitian	58
Lampiran 2	Pengukuran OD pertumbuhan bakteri pendegradasi Paraffin Oil pada medium Marine Broth (MB) inkubasi selama 12 hari	59
Lampiran 3	Senyawa alkana hasil GC/MS kontrol.....	60
Lampiran 4	Senyawa alkana hasil GC/MS isolat 97 hari ke-5	61
Lampiran 5	Senyawa alkana hasil GC/MS isolat 97 hari ke-9	62
Lampiran 6	Senyawa alkana hasil GC/MS isolat 19 hari ke-5	64
Lampiran 7	Senyawa alkana hasil GC/MS isolat 19 hari ke-9	65

BAB 1

PENDAHULUAN

Minyak bumi merupakan sumber energi utama yang digunakan untuk berbagai aktivitas manusia terutama untuk industri, transportasi dan rumah tangga dalam bentuk bahan bakar maupun bahan baku berbagai produk (Alvarez & Illman 2006: 4). Proses transportasi, eksplorasi dan distribusi minyak bumi dalam aktivitas industri umumnya dapat menyebabkan kontaminasi hidrokarbon pada lingkungan baik di daratan maupun perairan akibat tumpahan atau kebocoran minyak dan limbah minyak yang dihasilkan (Wang dkk. 2011: 47). Apabila keberadaan minyak bumi berlebihan di alam, masing-masing fraksi minyak bumi akan menyebabkan pencemaran yang akan mengganggu kestabilan ekosistem yang dicemarinya (Atlas 2011: 6710). Hidrokarbon yang terkandung pada minyak bumi adalah polutan utama pada lingkungan laut yang tercemar (Atlas & Cerniglia 1995: 332). Selain menjadi polutan utama, komponen hidrokarbon yang terdiri atas hidrokarbon jenuh, hidrokarbon aromatik, resin dan asphalten pada minyak bumi bersifat toksik sehingga berdampak pada kerusakan ekosistem dan terganggunya kesehatan manusia (Lisdiyanti dkk. 2011: 17).

Perairan pantai Indonesia banyak dilalui oleh kapal tanker pengangkut bahan bakar minyak. Pulau Jawa khususnya pada daerah Teluk Jakarta dan Kepulauan Seribu memiliki aktivitas industri dan transportasi yang pesat (Lisdiyanti dkk. 2011: 18). Frekuensi dan besaran minyak tumpah dari kegiatan transportasi laut, produksi minyak dan gas lepas pantai, serta bongkar muat minyak di Indonesia cukup tinggi. Salah satunya adalah kasus pencemaran minyak di perairan Cilacap. Selama kurun waktu dua tahun dari 2011 sampai dengan 2012 terdapat kasus pencemaran minyak dari 3 kapal tanker. Tahun 2011 terjadi 2 kasus pencemaran pada bulan Juli dan September oleh Kapal Super Tanker TT. Arenza XXVII dan Kapal MT. Medelin Atlas Belawan IMO 8717245. Selanjutnya, bulan April tahun 2012 Kapal MV. Indobaruna V kembali mencemari lingkungan laut Cilacap. Pencemaran minyak tersebut menyebabkan kerugian berupa kerusakan ekosistem dan penurunan kegiatan sosial ekonomi lautan (Purwendah & Djatmiko 2015: 31). Kasus tumpahan minyak lain

ditemukan di Balongan Indramayu yang terjadi pada bulan September 2008. Pencemaran minyak di sedimen Perairan Balongan dikarenakan adanya kebocoran pipa pengangkut minyak mentah (Umroh 2011: 23).

Salah satu metode yang dapat digunakan dalam proses pemulihan lingkungan yang tercemar minyak adalah secara biologi yaitu bioremediasi. Metoda tersebut relatif murah, lebih aman, dan tidak menghasilkan senyawa toksik ke lingkungan (Margesin dkk 2007: 259). Bioremediasi diperkirakan memerlukan biaya antara \$40--\$100 per m³, sedangkan jika menggunakan metode fisika-kimia memerlukan \$250—2800 per m³ (Crawford 1996: 1-2). Bioremediasi didefinisikan sebagai tindakan menambah atau meningkatkan ketersediaan bahan (nutrisi, mikroorganisme, atau oksigen) ke lingkungan yang terkontaminasi sehingga menyebabkan percepatan proses biodegradasi alami (Swannel dkk. 1996: 342). Polutan yang biasa dipulihkan dengan proses bioremediasi antara lain logam-logam berat, petroleum hidrokarbon, dan senyawa-senyawa organik terhalogenasi seperti pestisida, serta herbisida (Atlas & Cerniglia 1995: 332). Bioremediasi menggunakan mikroorganisme laut telah diterapkan untuk menurunkan berbagai senyawa-senyawa hidrokarbon jenuh dan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) pada cemaran minyak di laut (Atlas & Cerniglia 1995: 333)

Mikroorganisme yang memanfaatkan minyak sebagai sumber energi untuk pertumbuhan telah diketahui keberadaannya selama ratusan tahun (American Academy of Microbiology 2011:3). Beragam komunitas mikroorganisme ditemukan secara alami dapat mendegradasi komposisi terkandung dalam minyak pada daerah cemaran minyak (Head dkk. 2006: 173). Bahkan ketika konsentrasi minyak rendah, sebagian kecil mikroorganisme dengan kemampuan mendegradasi minyak selalu ditemukan (American Academy of Microbiology 2011:6). Beberapa tahun terakhir, suatu kelompok dari bakteri laut pendegradasi hidrokarbon telah diketahui peran pentingnya dalam pembersihan secara biologis dari air laut tercemar hidrokarbon (Yakimov dkk. 2007:1). Senyawa hidrokarbon merupakan komponen terbesar pembentuk minyak bumi dan digunakan sebagai sumber karbon oleh beberapa mikroorganisme, sedangkan senyawa non-

hidrokarbon merupakan nutrisi pelengkap bagi pertumbuhan, sehingga dapat melakukan metabolisme (Head dkk. 2006: 174).

Mekanisme yang terjadi dalam bioremediasi adalah degradasi atau pemutusan rantai hidrokarbon biasa disebut biodegradasi hidrokarbon minyak bumi (Udiharto 1999: 23). Degradasi senyawa hidrokarbon alkana dapat dianalisis dan dideteksi komponennya menggunakan metode kromatografi gas. Kromatografi gas digunakan dalam penelitian biodegradasi hidrokarbon karena dapat dengan cepat mendeteksi pemisahan senyawa mudah menguap (*volatile*) dan turunannya (Vazquez-Landaverde dkk. 2005: 3764).

Sebanyak 60% komponen penyusun minyak bumi terdiri atas senyawa hidrokarbon jenuh, yakni alkana, isoalkana dan sikloalkana (Fressenden & Fressenden 1990: 101). Alkana memiliki rantai karbon yang terdiri atas ikatan tunggal (Head dkk. 2006: 174). Senyawa alkana rantai panjang akan membentuk genangan, selaput minyak di perairan dan membentuk gumpalan (Leahy & Colwell 2000: 308) sedangkan alkana rantai pendek bersifat toksik (Sikkema dkk. 1995: 203). Secara umum alkana rantai tunggal lebih cepat didegradasi daripada senyawa hidrokarbon aromatik (Head dkk. 2006: 174). Jumlah bakteri yang mendegradasi komponen ini relatif banyak karena substratnya yang melimpah di dalam minyak bumi (Bacosa 2011: 1110).

Penelitian pemanfaatan mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon telah banyak dilakukan oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Penelitian Susilorukmi dkk. (2005: 32) mengaplikasikan mikroorganisme untuk bioremediasi *oil spill* dengan sistem dua tahap. Selanjutnya, Mangkurat & Yopi (2008: 29) melakukan isolasi dan identifikasi bakteri pendegradasi senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) dari perairan Cilacap. Penelitian tersebut menghasilkan 2 isolat potensial dengan kemampuan stabil mendegradasi senyawa PAH dari total 105 isolat yang diisolasi. Thontowi & Yopi (2011: 25) kemudian melakukan penelitian tentang deteksi gen monooksigenase, yang bertanggung jawab pada degradasi alkana, menggunakan bakteri pendegradasi alkana (*Alcanivorax* sp.) diisolasi dari Teluk Jakarta. Lisdiyanti dkk. (2011:17) kemudian melakukan isolasi bakteri pendegradasi minyak dari perairan Teluk Jakarta Marina terhadap senyawa PAH, hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 273

isolat bakteri didapatkan 223 isolat mampu mendegradasi senyawa PAH, namun belum dilakukan pengujian lebih lanjut dari isolat bakteri potensial pendegradasi minyak terhadap senyawa alkana. Berdasarkan hal tersebut pencarian mikroorganisme terutama bakteri berpotensi untuk mendegradasi senyawa alkana yang merupakan komponen penyusun utama minyak bumi diisolasi dari perairan tropis dan identifikasi jenis-jenis mikroorganisme pendegradasi senyawa alkana menjadi penting untuk dilakukan.

Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) memiliki koleksi isolat bakteri pendegradasi minyak sejumlah 100 isolat. Bakteri-bakteri tersebut diisolasi dari perairan dan daerah pasir tercemar tumpahan minyak di Pulau Pari Kepulauan Seribu. Isolat bakteri tersebut disimpan pada koleksi biakan mikroorganisme, *Indonesian Culture Collection* (InaCC) LIPI. Penapisan terhadap 100 isolat bakteri yang diuji kemampuan pertumbuhannya pada medium *Marine Agar + Paraffin oil* telah dilakukan dan menghasilkan 15 isolat yang memiliki kemampuan menggunakan alkana sebagai sumber karbon ditunjukkan dengan terdispersinya *Paraffin oil* disekitar isolat pada permukaan medium. Isolat-isolat bakteri hasil penapisan tersebut perlu diuji kemampuannya melakukan degradasi terhadap senyawa alkana dengan uji pertumbuhan pada medium *Marine broth + Paraffin oil* dan bakteri potensial diidentifikasi untuk menambah informasi keragaman bakteri yang dapat mendegradasi alkana.

Penelitian bertujuan untuk memperoleh isolat dengan kemampuan tinggi mendegradasi alkana berdasarkan analisis Kromatografi Gas. Hipotesis dalam penelitian ini adalah isolat bakteri dari Pulau Pari memiliki kemampuan mendegradasi senyawa alkana.

BAB 2 **TINJAUAN PUSTAKA**

2.1. Minyak Bumi

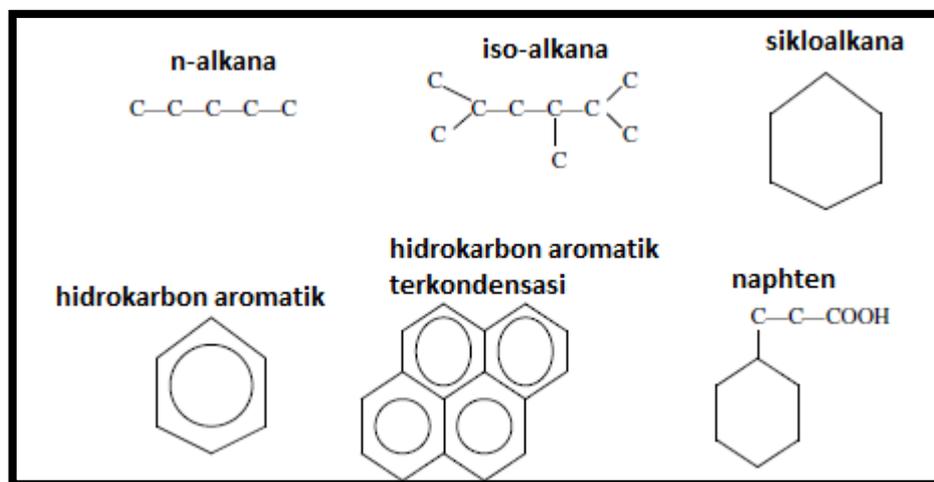
Minyak bumi merupakan campuran kompleks hidrokarbon padat, cair dan gas yang merupakan hasil akhir penguraian bahan-bahan hewani dan nabati yang telah terpendam dalam kerak bumi dalam waktu lama dan mengandung sedikit senyawa nitrogen dan belerang. Minyak bumi merupakan campuran senyawa hidrokarbon dan beberapa komponen non-hidrokarbon (Atlas dkk. 1992: 49). Kandungan senyawa hidrokarbon dalam minyak bumi lebih dari 75%. Senyawa hidrokarbon dapat berwujud cair atau kental dan *volatile* atau *non-volatile*. Minyak bumi dari berbagai sumber pada umumnya mempunyai komposisi kimia yang berbeda-beda. Komposisi dasar minyak bumi adalah karbon (C) 83-87%, hidrogen (H) 11-14%, sulfur (S) 0.01-8%, oksigen (O) 0-2%, nitrogen (N) 0.01-1.7% dan logam 0-0.1% (Saverin dkk. 1981: 390).

Hidrokarbon, sebagai bahan utama terkandung dalam minyak bumi, berdasarkan bentuk rantai karbonnya digolongkan menjadi hidrokarbon rantai jenuh (*n*-alkana, isoalkana dan sikloalkana), hidrokarbon aromatik, resin dan asphalten (Wang dkk. 2013:48). Hidrokarbon rantai jenuh terutama kelompok alkana (C₈ sampai C₄₄) merupakan komponen utama minyak mentah yaitu sebanyak 65,6 %, sementara hidrokarbon aromatik memiliki komposisi sebanyak 23,4%, resin 4,3 % dan asphalten 6,4 % (Toledo dkk. 2006: 244).

Hidrokarbon aromatik mempunyai satu atau lebih cincin aromatik dengan atau tanpa tersubstitusi alkil. Hidrokarbon dengan lebih dari satu cincin aromatik disebut dengan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) contohnya naphthalena, sedangkan yang tersubstitusi dikenal dengan polisiklik aromatik hidrokarbon substitusi (PAHs) contohnya etilbenzena (Fessenden & Fessenden 1986: 86). Umumnya senyawa-senyawa dalam kategori ini bersifat karsinogenik dan mutagenik. Resin dan asphalten berisi senyawa hidrokarbon non polar, dan memiliki struktur kompleks. Senyawa asphalten dan resin dalam proses biodegradasinya cukup sulit dilakukan karena memiliki resistensi terhadap

mikroorganisme dan membutuhkan surfaktan dalam prosesnya (Lisdiyanti 2009: 16).

Komponen minyak bumi yang mudah didegradasi oleh bakteri merupakan komponen terbesar dalam minyak bumi atau mendominasi, yaitu alkana. Jumlah bakteri yang mendegradasi komponen relatif banyak karena senyawa alkana melimpah di dalam minyak bumi (Atlas 2011: 6713). Komponen minyak bumi yang sulit didegradasi merupakan komponen yang jumlahnya lebih kecil dibanding komponen yang mudah didegradasi contohnya resin dan asphalten. Resin dan asphalten merupakan senyawa kompleks dengan cincin aromatik atau alisklik pada molekul. Hal tersebut menyebabkan semakin sulit suatu senyawa didegradasi. Senyawa tersebut menyebabkan bakteri pendegradasi resin dan asphalten lebih sedikit dan tumbuh lebih lambat karena kalah bersaing dengan pendegradasi alkana karena alkana memiliki komposisi yang lebih banyak (Toledo dkk. 2006: 246)



Gambar 2.1. Struktur kimia senyawa hidrokarbon alifatik dan aromatik
[Sumber: Allowey & Ayres 1993]

2.2 Bioremediasi Cemaran Minyak

Bioremediasi merupakan suatu proses penting bagi rehabilitasi lingkungan yang tercemar minyak bumi ataupun produk-produknya, dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme untuk menguraikan pencemar tersebut menjadi bentuk

lebih sederhana, tidak berbahaya dan memberikan nilai tambah bagi lingkungan. Semua mikroorganisme mampu mengkonsumsi substrat dari alam untuk pertumbuhan dan metabolismenya. Kemampuan untuk mendegradasi tergantung pada enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme. Minyak bumi dapat didegradasi oleh mikroorganisme karena kemampuannya menghasilkan enzim yang selektif terhadap minyak sebagai substratnya (Herdiyantoro 2005: 29). Degradasi minyak bumi dilakukan 80% oleh bakteri karena dapat menggunakan hidrokarbon minyak bumi sebagai sumber karbon dan energi serta menghasilkan surfaktan sehingga bakteri dapat tumbuh (Harayama dkk. 1999: 67).

Bioremediasi senyawa hidrokarbon memiliki dua pendekatan utama, yaitu bioaugmentasi dan biostimulasi. Bioaugmentasi merupakan metode dengan menginokulasikan mikroorganisme pendegradasi minyak ke daerah tercemar minyak untuk melengkapi populasi mikroorganisme yang telah ada (Bacosa dkk. 2011: 1110). Biostimulasi merupakan metode yang dilakukan dengan menambahkan nutrisi untuk menstimulasi mikroorganisme indigenus agar dapat mendegradasi minyak (Wang dkk. 2011: 48).

Kecepatan biodegradasi oleh mikroorganisme dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu: (1) Enzim spesifik oksigenase yang terikat pada membran; dan (2) Mekanisme untuk mengoptimalkan kontak antara mikroorganisme dengan hidrokarbon (Wang dkk. 2011: 50). Saat bioremediasi terjadi, enzim-enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme memodifikasi polutan beracun dengan mengubah struktur kimia polutan. Enzim mempercepat proses tersebut dengan cara menurunkan energi aktivasi, yaitu energi yang dibutuhkan untuk memulai suatu reaksi. Terjadi proses penguraian senyawa toksik menjadi senyawa kurang atau tidak toksik (Thomas & Ward 1994: 232).

Biodegradasi senyawa kimia oleh mikroorganisme di lingkungan merupakan proses penting untuk mengurangi kadar bahan-bahan berbahaya di lingkungan, melalui reaksi kimia kompleks dan menjadi senyawa metabolit yang tidak berbahaya dan tidak beracun (Wang dkk. 2011: 48-49). Mikroorganisme dalam proses degradasi menggunakan senyawa kimia untuk pertumbuhan dan reproduksi melalui berbagai proses oksidasi. Enzim yang dihasilkan berperan untuk mengkatalis reaksi degradasi (Penet dkk. 2006: 577).

2.3 Senyawa Hidrokarbon Alkana

Alkana atau parafin, merupakan hidrokarbon jenuh dengan rantai lurus (normal) atau bercabang (iso) mengandung gugus karbon dan hidrogen dengan memiliki rumus umum C_nH_{2n+2} (Fessenden & Fessenden 1986: 86). Alkana merupakan senyawa non-polar sehingga sukar larut dalam air. Umumnya alkana memiliki 5 sampai 40 atom karbon per molekul. Alkana dari pentana (C_5H_{12}) sampai oktana (C_8H_{18}) disempurnakan menjadi bensin, nonana (C_9H_{20}) sampai heksadekana ($C_{16}H_{34}$) menjadi bahan bakar diesel, minyak tanah dan bahan bakar jet. Senyawa dengan lebih dari 16 atom karbon dapat disempurnakan menjadi bahan bakar minyak dan minyak pelumas (Moffat dkk. 1997: 6). Alkana dengan atom karbon lebih dari 35 memiliki bentuk padat seperti aspal sedangkan molekul terpendek, dengan 4 atau lebih sedikit atom karbon, pada suhu ruang berada dalam keadaan gas (Hasanshahian dkk. 2011:301).

Hidrokarbon rantai jenuh yaitu kelompok alifatik yang terdiri atas senyawa alkana dan silkoalkana merupakan komponen utama minyak mentah sebesar 60% (Head dkk. 2006: 174). Analisis alkana menggunakan metode *Gas Chromatography* (GC) dilakukan dengan kolom non-polar dan pemisahan didasarkan pada titik didih. Semakin banyak atom karbon pada alkana maka titik didihnya semakin tinggi. Kenaikan titik didih disebabkan oleh menguatnya gaya tarik menarik antara molekul. Alkana normal mendidih beberapa derajat lebih tinggi dari alkana yang bercabang (Zeng dkk. 2012: 364).

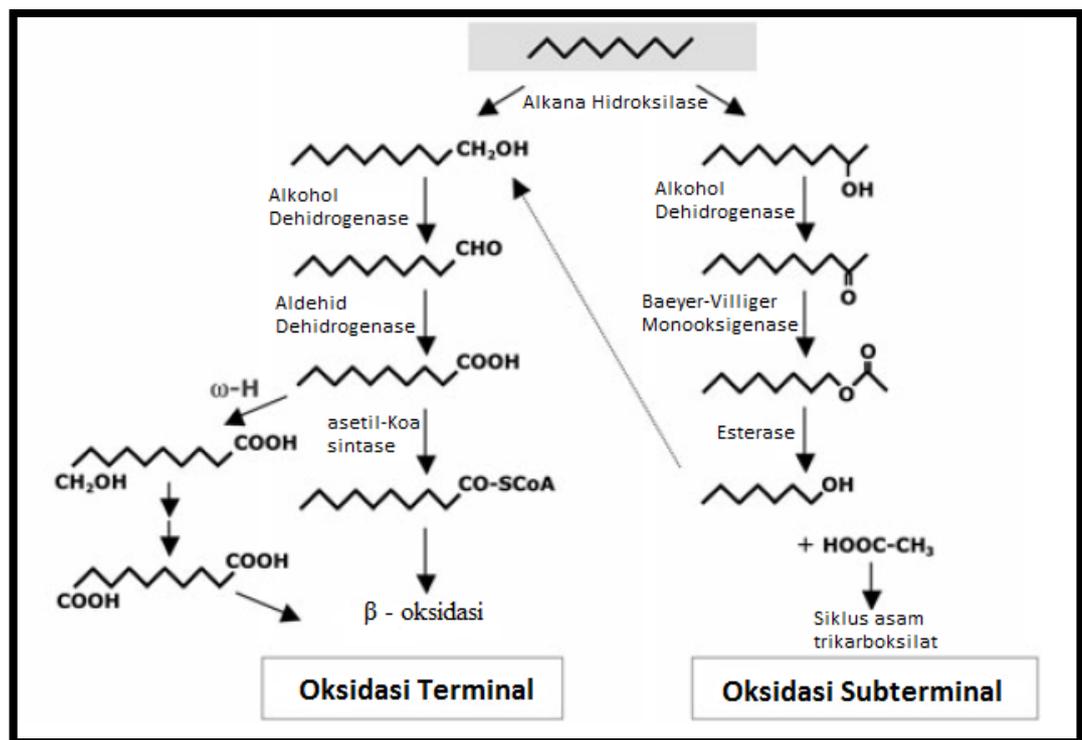
Senyawa	Titik Didih (°C)
n-Oktana	126
2-metilheptana	116
3-metilheptana	118
4-metilheptana	117

Gambar 2.3.(1) Titik didih oktana dan isomernya

[Sumber: Zeng dkk. 2012: 364]

Proses biodegradasi alkana dapat berlangsung secara aerob dan anaerob. Mekanisme degradasi alkana secara aerob menggunakan bantuan oksigen

sebagai kofaktor. Proses oksidasi dapat terjadi pada rantai gugus C terminal untuk alkana rantai tunggal (n-alkana) dan pada gugus C subterminal untuk alkana rantai cabang. Pemutusan rantai alkana pada gugus rantai C terminal (Gambar 2.2.(2)) Tahap pertama, setelah terjadi kontak antara bakteri dan alkana melalui mekanisme adhesi spesifik dan produksi biosurfaktan adalah dengan masuknya komponen hidrokarbon rantai jenuh ke sitoplasma sel bakteri. Molekul alkana pada gugus rantai C terminal bereaksi dengan atom oksigen pada sitoplasma sel dengan katalis monooksigenase kemudian satu gugus hidroksil masuk ke dalam molekul hidrokarbon. Oksidasi pada metil terminal menghasilkan alkohol primer yang selanjutnya dioksidasi menjadi aldehida dan akhirnya diubah menjadi asam lemak. Asam lemak berkonjugasi dengan KoA dan diproses lebih lanjut oleh β -oksidasi menghasilkan asetil-KoA (Hamme dkk. 2003: 541 ; Rojo 2009: 2479).



Gambar 2.3.(2) Jalur degradasi alkana gugus C terminal & subterminal

[Sumber: Rojo 2009: 2479]

Pemutusan rantai alkana pada gugus C subterminal (Gambar 2.2.(2)) Oksidasi pada rantai C subterminal menghasilkan alkohol sekunder. Proses selanjutnya terjadi dehydrogenase gugus hidroksil alkohol sekunder menjadi keton kemudian teroksidasi oleh monooxygenase menjadi ester. Ester dihidrolisis oleh esterase, menghasilkan alkohol dan asam lemak kemudian dilanjutkan dengan proses karboksilasi. Setelah proses β -oksidasi, terbentuk asetil Ko-A dan kemudian bergabung dengan jalur metabolisme dalam sel bakteri untuk menghasilkan CO_2 , H_2O dan energi untuk pertumbuhan bakteri (Rojo 2009: 2479).

2.4 Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme uniseluler prokariot yang sederhana, diameter 0,2--2,0 μm dan panjang 2--8 μm . Bentuk dasar dari bakteri antara lain kokus (bulat, lonjong, memanjang, atau pipih di satu sisi), basilus (batang), dan spiral (Benson 2001:46). Umumnya bakteri hanya memiliki satu bentuk (monomorfik), tetapi beberapa bakteri seperti *Rhizobium* dan *Corynebacterium* memiliki beberapa bentuk (pleomorfik) tergantung dari kondisi lingkungannya (Tortora dkk. 2010: 77—79).

Struktur sel bakteri terdiri dari beberapa komponen, antara lain dinding sel, flagela, kapsul, membran sel, endospora, dan nukleoid (Benson 2001:46). Dinding sel bakteri tersusun oleh kompleks karbohidrat dan protein yang disebut peptidoglikan (Madigan dkk. 2012: 32). Flagela merupakan organ berbentuk panjang dan ramping yang berfungsi sebagai alat gerak. Kapsul, atau disebut juga glikokaliks, tersusun oleh polisakarida, polipeptida, atau keduanya. Membran sel memiliki tiga fungsi utama, yaitu memelihara tekanan osmosis, sistem transport aktif, dan menyediakan tempat untuk reaksi utama enzim (Tortora dkk. 2010:89).

Endospora merupakan suatu badan refraktil dengan tingkat metabolisme rendah yang terdapat di dalam sel, serta merupakan suatu stadium istirahat dari sel tersebut (Tortora dkk. 2010: 79). Bakteri tidak memiliki membran inti sehingga daerah nukleusnya disebut nukleoid (Madigan dkk. 2012: 32). Struktur nukleoid berupa masa amorf globuler yang terdiri dari banyak materi kromatin yang fibriler (Tortora dkk. 2010: 80).

Berdasarkan struktur dinding selnya, bakteri dibedakan menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan yang tebal dan asam teikoat, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis (15-20%) dan memiliki lapisan lipopolisakarida yang tebal (Madigan dkk. 2012: 32). Asam teikoat pada bakteri Gram positif berfungsi untuk menstabilkan dinding sel (Singh & Kapoor 2010: 31-32).

2.5 Bakteri Pendegradasi Minyak

Beberapa bakteri dan fungi diketahui dapat digunakan untuk mendegradasi minyak bumi. Bakteri tertentu dapat menguraikan komponen hidrokarbon minyak bumi sebagai elektron donor dengan cara oksidasi pada kondisi aerob (Thomas & Ward 1994: 232). Bakteri yang dapat menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon dikenal sebagai bakteri hidrokarbonoklastik. Contoh dari bakteri hidrokarbonoklastik yaitu bakteri dari genus *Alcanivorax* (Yakimov dkk. 2007: 257), *Cycloclasticus* (Dyksterhouse dkk. 1995: 116), *Oleiphilus* (Golyshin dkk. 2002: 901), *Oleispira* (Yakimov dkk. 2004: 520), *Xanthomyces* dan *Pseudomonas* (Harayama dkk. 2004: 205)

Keberhasilan biodegradasi hidrokarbon minyak bumi tergantung kepada aktivitas mikroorganisme dan kondisi lingkungannya. Bakteri mampu beradaptasi pada lingkungan hidrokarbon melalui beberapa cara, yaitu dengan pembentukan bagian hidrofobik pada dinding sel sehingga meningkatkan afinitas sel terhadap hidrokarbon, dihasilkannya surfaktan ekstraseluler yang dapat meningkatkan kelarutan hidrokarbon dan modifikasi intraseluler membran sitoplasmik yang dapat mengurangi toksisitas hidrokarbon terhadap bakteri (Thomas & Ward 1994:232).

Mikroorganisme menggunakan hidrokarbon minyak untuk pertumbuhannya dengan memotong senyawa hidrokarbon rantai jenuh dan aromatik (Thomas & Ward 1994:234). Mekanisme biodegradasi minyak sangat beragam tergantung pada komposisi hidrokarbon yang dikandungnya. Secara umum alkana rantai lurus lebih cepat didegradasi daripada alkana rantai cabang.

n-alkana yang mudah dan cepat terdegradasi adalah yang mengandung rantai C₁₀–C₁₈ (Smith dkk. 2012: 139).

Terdapat tiga cara transpor hidrokarbon ke dalam sel bakteri, yaitu:

- (1) Interaksi sel dengan hidrokarbon yang terlarut dalam fase air.
- (2) Kontak langsung (perlekatan) sel dengan permukaan tetesan hidrokarbon yang lebih besar daripada sel mikroorganisme.

Perlekatan dapat terjadi karena sel bakteri bersifat hidrofobik. Sel mikroorganisme melekat pada permukaan tetesan hidrokarbon yang lebih besar daripada sel dan pengambilan substrat dilakukan dengan difusi atau transpor aktif. Perlekatan ini terjadi karena adanya biosurfaktan pada membran sel bakteri.

- (3) Interaksi sel dengan tetesan hidrokarbon yang telah teremulsi atau tersolubilisasi oleh bakteri.

Sel mikroorganisme berinteraksi dengan partikel hidrokarbon yang lebih kecil daripada sel. Hidrokarbon dapat teremulsi dan tersolubilisasi dengan adanya biosurfaktan yang dilepaskan oleh bakteri ke dalam medium.

(Smith dkk. 2012: 140 ; Hua & Wang 2014:165).

2.6 Pertumbuhan Bakteri

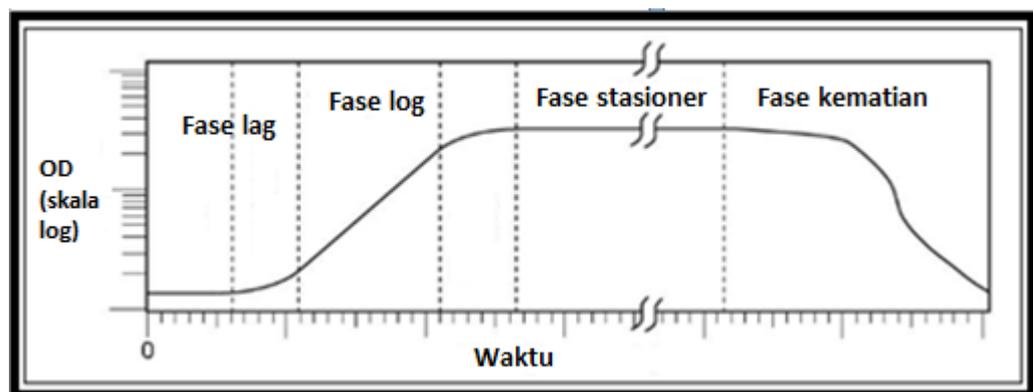
Kurva pertumbuhan bakteri pada suatu media kultur dapat dibagi menjadi beberapa fase, yaitu *lag*, *log*, *stationer* dan *death* (Pelczar & Chan 1986: 357). Fase lag atau disebut fase adaptasi menggambarkan waktu yang diperlukan oleh bakteri untuk menyesuaikan diri pada lingkungan baru. Ketika terjadi penambahan suatu inokulum dalam suatu media kultur. Fase tersebut merupakan waktu yang dibutuhkan untuk produksi enzim-enzim baru yang akan memulai reaksi. Fase lag dapat terjadi jika inokulum ditransfer dari kultur kompleks ke kultur sederhana (Madigan dkk. 2012: 132).

Fase log atau fase eksponensial merupakan fase sel-sel bakteri akan membelah diri pada kecepatan sesuai dengan kemampuannya untuk mengolah

sumber nutrisi. Nutrisi pada medium masih tersedia cukup banyak dan kecepatan pertumbuhan bakteri hanya ditentukan oleh kemampuannya mengolah substrat tersebut. Laju pertumbuhan pada fase log mencapai nilai konstan dan jumlah sel bertambah secara linier dengan pertambahan waktu (Madigan dkk. 2012: 132)..

Pertumbuhan bakteri pada fase stasioner menunjukkan tidak adanya peningkatan maupun penurunan dari jumlah sel (laju pertumbuhan 0). Jumlah populasi bakteri dalam keadaan tetap, hal ini disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel baru seimbang dengan kematian sel-sel lama (Madigan dkk. 2012: 133). Fase stasioner dapat terjadi karena nutrisi esensial pada medium kultur telah mulai habis digunakan dan adanya produk sampingan hasil metabolisme yang terakumulasi pada medium sehingga menghambat pertumbuhan (Pelczar & Chan 1986: 357).

Fase kematian merupakan fase ketika kecepatan kematian sel-sel bakteri lebih besar daripada kecepatan pembentukan sel-sel baru. Kecepatan kematian bakteri biasanya mempunyai sifat khas sesuai dengan lingkungannya. Fase kematian merupakan kebalikan dari fase lag karena konsentrasi nutrisi di dalam medium telah habis. Proses lisis selama fase kematian dapat terjadi, yaitu proses difusi nutrisi yang keluar dari sel-sel yang masih hidup sehingga tingkat reproduksi makin menurun serta jumlah kematian sel mikroorganisme semakin meningkat (Madigan dkk. 2012: 132).



Gambar 2.6. Kurva pertumbuhan bakteri

[Sumber:Widdel 2010: 8]

2.7 KROMATOGRAFI GAS

Kromatografi gas atau *Gas Chromatography* (GC) merupakan teknik untuk memisahkan senyawa mudah menguap dengan mengalir fase gerak melalui fase diam menjadi bentuk molekul lebih kecil (Penet dkk. 2006: 579). Fase gerak dapat berupa gas sedangkan fase diam dapat berupa zat padat atau zat cair. Tekanan uap memungkinkan komponen menguap dan bergerak bersama-sama dengan fase gerak yang berupa gas. Kromatografi Gas banyak digunakan dalam analisis substansi yang mudah menguap (*volatile*) dan secara thermal stabil (Vazquez-Landaverde dkk. 2005: 3764).

Terdapat tiga faktor yang perlu dipertimbangkan dalam melakukan analisis menggunakan Kromatografi Gas, yaitu:

(1) Pemilihan Kolom

Kolom biasanya terbuat dari baja nirkarat, aluminium atau kaca berbentuk lurus, lengkung atau melingkar. Panjang kolom digunakan beragam antara 1-4 meter. Semakin tinggi panjang kolom menghasilkan daya pisah senyawa yang lebih besar.

(2) Pengaturan Suhu Injektor, Oven, dan Detektor

Injektor berada dalam oven yang suhunya dapat dikontrol. Panas dari oven akan mendidihkan sampel dan diangkut ke kolom oleh gas pembawa misalnya helium atau gas lainnya. Suhu kolom disesuaikan atau diatur mendekati titik didih dari komponen primer dari sampel.

(3) Pengaturan Aliran Gas

Pengatur aliran digunakan untuk menjaga aliran gas tetap konstan. Aliran gas yang konstan sangat diperlukan pada kromatografi gas agar diperoleh analisis data akurat. Kecepatan aliran gas rendah menghasilkan pemisahan senyawa lebih baik dibandingkan dengan kecepatan aliran gas tinggi.

(Andriyanto 2010: 17 ; Staples 2010: 10 ; Zeng dkk. 2012: 364).

Kromatografi Gas memiliki dua macam detektor, yaitu *flame ionization detector* (FID) dan *thermal conductivity detector* (TCD). FID merupakan detektor sensitif yang umum digunakan dalam mengukur jumlah atom karbon senyawa organik dan sesuai untuk analisis hidrokarbon seperti polisiklik aromatik hidrokarbon serta alifatik hidrokarbon. TCD bersifat universal dan sesuai untuk analisis air, gas-gas dan senyawa anorganik terutama senyawa yang mengandung halogen (Meier dkk. 2000: 237). Instrumen Kromatografi Gas banyak digabungkan bersama *Mass Spectrometer* (MS) menghasilkan kombinasi dengan analisis lebih detail. Kromatografi Gas memisahkan senyawa satu dengan senyawa lainnya, sedangkan MS membantu untuk mengidentifikasi senyawa tersebut berdasarkan pola fragmentasinya (Demain & Davies 1999: 175).

Kromatografi Gas umum digunakan dalam beberapa penelitian tentang analisis minyak mentah dan atsiri dalam buah serta analisis senyawa organik yang mudah menguap seperti hidrokarbon dan eter (Vazquez-Landaverde dkk. 2005: 3764). Metode tersebut dapat digunakan untuk analisis secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi dari substansi yang dianalisis dengan waktu analisis dari suatu pembanding, sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan tinggi dan luas puncak kromatogram dari substansi yang dianalisis dengan tinggi atau luas puncak kromatogram dari pembanding (Andriyanto 2010: 12 ;Staples 2010: 4).

Pemisahan senyawa didasarkan pada kekuatan yang berbeda dari interaksi senyawa dengan fase diam. Semakin kuat interaksi, semakin lama senyawa berinteraksi dengan fase diam dan lebih banyak waktu dibutuhkan untuk bermigrasi melalui kolom sehingga menghasilkan waktu retensi lebih lama (Zeng 2012: 367). Kelebihan dari metode analisis tersebut adalah menghasilkan pemisahan sempurna dari semua molekul organik secara efisien dan selektif, pengerjaannya sederhana dan cepat, menggunakan detektor yang tidak berifat merusak, sampel yang digunakan relatif sedikit dan sensitivitas tinggi (Demain & Davies 1999: 175 ; Miller 2005: 179).

BAB 3 METODOLOGI

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteri Pusat Penelitian Biologi *Indonesian Culture Collection* (InaCC), Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong selama 4 bulan (Februari sampai Juni 2015) dan analisis Kromatografi Gas dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik (PUSLABFOR) Kepolisian Republik Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam kerja praktek ini antara lain tabung reaksi [IWAKI PYREX], cawan petri plastik steril [GOSELIN], autoklaf [TOMY SX-500], labu Erlenmeyer [IWAKI PYREX], gelas ukur [IWAKI PYREX], spatula, magnetik bar, magnetik stirrer, inkubator [SANYO INCUBATOR], thermal cycler [Applied Biosystem], microwave [Panasonic], Gel documentation [BIORAD], centrifuge [BIORAD], vorteks [BIORAD], mikropipet [Eppendorf], laminar air flow [GELMAN SCIENCES], jarum ose, timbangan analitik, pengaduk kaca, kompor listrik (hot plate), micro tips, spektrofotometer [THERMO SCIENTIFIC], evaporator [IKA] dan *Gas Chromatography* [SHIMADZU]

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah 15 isolat bakteri laut koleksi *Indonesian Culture Collection* (InaCC) LIPI diisolasi dari laut tercemar minyak bumi di lingkungan dermaga Pulau Pari, Kepulauan Seribu.

3.2.2.2 Medium

Medium yang digunakan adalah medium selektif *Marine Agar* (MA) [Difco] dan *Marine Broth* (MB) [DIFCO]. Komposisi medium MA dan MB dalam 1 Liter yaitu 5 g *peptone*, 1 g *yeast extract*, 0,1 g *Ferric citrate*, 19,45 g NaCl, 3,24 g MgSO₄, 1,8 g CaCl₂, 0,55 g KCl, 0,08 g KBr, 0,16 g NaHCO₃, 34,0 mg SrCl₂, 22 mg H₃BO₃, 4 mg NaSiO₂, 2,4 mg NaF, 1,6 mg NH₄NO₃, 8,0 mg Na₂PO₄.

3.2.2.3 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian adalah primer 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') [1st BASE], primer 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTAYGACTT) [1st BASE], diklorometan, ddH₂O, gel agarosa [DIFCO], TAE (*Tris Acetate* EDTA), Go Taq *solution* [PROMEGA], *nuclease free water* [PROMEGA], Na₂SO₄, dan paraffin oil [MERCK].

3.3 CARA KERJA

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.1 Pembuatan Medium

3.3.1.1 *Marine Agar* (MA)

Sebanyak 55,1g *marine agar* ditambahi akuades hingga volume menjadi 1.000 mL, kemudian dipanaskan menggunakan kompor listrik sampai mendidih dan larut sambil diaduk dengan *magnetic stirer* hingga homogen. Medium disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi dan setelah steril, medium dituang ke cawan petri plastik sebanyak 15--20 ml dan didinginkan hingga mengeras.

3.3.1.2 *Marine Broth* (MB)

Sebanyak 3,74g *Marine Broth* ditambahi akuades hingga volume menjadi 100 ml, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* pada *magnetic plate* hingga homogen. Setelah homogen, pH disesuaikan sampai 7,5. Jika terlalu asam atau basa dapat ditambahkan NaOH atau HCl hingga pH sesuai. Medium disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi.

3.3.2 Pembuatan *Stock* dan *Working Culture*

Koloni tunggal hasil pemurnian digunakan untuk membuat *stock* dan *working culture*. Biakan murni bakteri dipindahkan ke dua tabung medium MA miring. Sebanyak dua tabung biakan dari masing-masing isolat bakteri disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C dan digunakan sebagai *stock culture*. Peremajaan *stock culture* dilakukan setiap enam bulan sekali. Biakan bakteri kemudian dipindahkan ke medium MA miring dan menjadi *working culture*. Biakan *working culture* disimpan pada suhu 27—30°C. Peremajaan *working culture* dilakukan sebulan sekali (Yarrow 1998: 78).

3.3.3 Uji Pertumbuhan Isolat Bakteri Pendegradasi Alkana

Prekultur seleksi dibuat dari isolat potensial hasil penapisan pada medium padat ditumbuhkan pada medium *Marine Broth* (MB). Medium MB 100% dimasukkan sebanyak 3 mL ke masing-masing tabung reaksi 20 mL. Sebanyak 1 ose isolat bakteri yang mempunyai kemampuan mendegradasi alkana diinokulasikan pada tabung reaksi berisi MB, divortex agar tercampur sempurna, diinkubasi dalam *shaker incubator* suhu 27—30°C dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam.

Penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut: (1) Sebanyak 500 µL inokulum prekultur ditambahkan kedalam tabung reaksi berisi 5 ml MB 20% dan 250 µL paraffin oil sebagai perlakuan; (2) Medium MB 20% dan 250 µL paraffin oil sebagai kontrol negatif; dan (3) Medium MB 20% dengan penambahan isolat sebagai kontrol positif. Dilakukan tiga kali pengulangan (triplo) pada setiap perlakuan. Sampel diinkubasi dalam *incubator shaker* kecepatan 150 rpm selama

12 hari, perubahan pH dicatat dan pertumbuhan isolat diukur berdasarkan kerapatan optik pada λ 600 nm setiap 24 jam (Lisdiyanti 2009: 16).

3.3.4 Ekstraksi Senyawa Hidrokarbon

Ekstraksi senyawa hidrokarbon menggunakan metode Adebusoje (2007) dan Thontowi (2008) yang telah dimodifikasi. Ekstraksi dilakukan pada labu Erlenmeyer berisi 100 mL medium MB + *paraffin oil* + suspensi isolat bakteri dengan kurva pertumbuhan terbaik diinkubasi selama 9 hari dan diekstraksi pada hari ke-0, ke-5 dan ke-9. Sebanyak 5 mL kultur terlebih dahulu disentrifugasi untuk memisahkan antara sel bakteri dan medium dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 27--30°C selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil dengan pipet lalu dimasukkan dalam tabung falcon berbeda. Supernatan kultur lalu ditambahkan diklorometan dengan perbandingan volume 1:1. Sampel kultur dan diklorometan dikocok kuat selama 1 menit sampai menghasilkan dua lapisan (bagian atas: medium ; bagian bawah: diklorometan). Setelah lapisan bagian atas dipindahkan dengan pipet, lapisan bagian bawah ditambahkan Na₂SO₄ sebanyak 0,5 g untuk menghilangkan kandungan air. Ekstrak selanjutnya dipekatkan dengan alat evaporator dengan suhu 40 °C selama \pm 3—4 menit hingga mengering. Evaporator merupakan alat yang digunakan untuk memekatkan suatu larutan. Ekstrak dilarutkan kembali dengan diklorometan sebanyak 500 μ L sebelum diinjeksikan dan dipindahkan ke dalam botol vial lalu disimpan untuk analisis senyawa dengan *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*.

3.3.5 Analisis Senyawa Alkana

Analisis kadar senyawa alkana dilakukan menggunakan Kromatografi Gas. Kondisi pengujian menggunakan kolom kapiler (HP1) silika panjang 30cm, diameter 0,35 mm, tebal film 0,33 μ m. Temperatur oven untuk analisis diatur pertama kali pada suhu 60 °C selama 2 menit kemudian kenaikan suhu 10 °C /menit hingga mencapai suhu 280 °C lalu didiamkan selama 15 menit. Kecepatan alir 6 mL/menit, suhu detektor 300 °C dan suhu injektor 240 °C. Gas pembawa yang digunakan ialah gas nitrogen (Thontowi 2008: 13). Persentase penurunan

aktivitas degradasi senyawa alkana dilakukan dengan membandingkan hasil kromatogram sisa alkana di dalam kultur bakteri (perlakuan) dengan kandungan alkana standar pada paraffin oil (kontrol). Puncak yang memiliki waktu retensi yang hampir sama dan konsisten terdapat pada masing-masing kromatogram kontrol dan perlakuan dipilih kemudian dihitung penurunan konsentrasi dengan membandingkan luas area puncak yang terdapat pada kromatogram (Zeng 2012: 368).

3.3.6 Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri

Identifikasi molekuler isolat bakteri menggunakan perbandingan urutan gen 16S rRNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode *Polimerase Chain reaction* menggunakan primer spesifik 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') untuk primer *forward* dan 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTAYGACTT-3') untuk primer *reverse*. Sebanyak 2 μ L hasil isolasi DNA dicampurkan dengan primer 9F dan 1492R masing-masing 0,5 μ L, larutan DMSO 0,5 μ L, larutan Go Taq 10 μ L, dan ddH₂O 12,4 μ L kemudian dimasukkan ke dalam tabung PCR. Kondisi reaksi PCR diawali dengan satu siklus denaturasi awal pada suhu 95°C selama 1 menit. Tahap berikutnya adalah denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 56°C selama 1 menit, dan pemanjangan fragmen DNA pada suhu 72°C selama 2 menit. Ketiga tahapan tersebut berulang sebanyak 35 siklus. Tahapan selanjutnya adalah pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 7 menit (Thontowi 2008: 14).

Sebanyak 1 μ L hasil PCR diukur konsentrasi kemurniannya menggunakan Nano-Drop® *Spectrophotometer*. Pemeriksaan sampel DNA dilakukan dengan elektroforesis. Sebanyak 2,5 μ L DNA produk PCR dimasukan kedalam sumur-sumur pada gel. Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1% selama 20 menit. Gel agarosa yang telah dielektroforesis kemudian direndam dalam larutan GelRed selama 30 menit. Visualisasi hasil amplifikasi dilakukan menggunakan *gel documentation*.

Produk PCR kemudian disekuensi dengan jasa sekuensing 1st BASE. Hasil sekuensi yang diperoleh dicari sekuensi homologinya dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide* (BLAST) pada situs

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Program BLAST kemudian akan membandingkan data sekuens yang dikirim dengan sekuens yang sudah terdaftar dalam database DNA. Program yang dipilih adalah BLASTN karena digunakan untuk mengetahui homologi basa nukleotida. Berdasarkan perbandingan data tersebut, diperoleh homologi atau persentase kemiripan sekuens terhadap spesies terdekat dalam database (Altschul dkk. 1997: 3389 & 3401). Proses penyejajaran sekuens dengan menggunakan program *ClustalX* dan kontruksi pohon filogenetik menggunakan program MEGA 6.

3.3.7 Analisis dan Penyajian Data

Data hasil penelitian berupa data pengukuran nilai *optical density* (OD) pertumbuhan isolat berupa tabel dan grafik, data pH berupa tabel, data degradasi senyawa alkana dengan kromatogram dan tabel, hasil visualisasi elektroforesis PCR dan data pohon filogeni dengan program MEGA 6 berupa gambar.