

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat-alat gelas, neraca analitik (Ohaus®), inkubator (Mettler®), *autoclave* (GEA® LS-50 LJ My Life MA 678GE), *laminar airflow* (ERSA Scientific®), *shaker*, lemari pendingin, vortex (Barnstead thermolyne), pH meter (Mettler Toledo Seven), spektrofotometer UV-Visibel (Shimadzu UV Spectro), mikropipet, *blue tip* dan *yellow tip*, kawat ose, tabung valcon, vial, pelat KLT, pipa kapiler, chamber.

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri *Bacillus cereus*, bakteri *Brevundimonas terraе*, media *Nutrient Agar*, media *Blood Base Agar*, aquadest, media *Nutrient Broth*, media *Mueller Hinton Agar*, minyak kelapa, kloroform, metanol, etanol, aseton, ninhidrin, kloramfenikol.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Peremajaan Isolat Bakteri

Proses peremajaan bakteri berdasar pada (Anggraini *et al.*, 2013) peremajaan dilakukan dengan memindahkan satu sampai dua ose tiap mikroba ke dalam medium NA baru di dalam tabung reaksi dalam bentuk miring. Kemudian digoreskan pada medium NA diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam.

3.3.2 Penapisan Isolat Bakteri Penghasil Biosurfaktan

A. Hemolisis

Proses hemolisis isolat bakteri berdasar pada (Saravanan & Vijayakumar, 2012), yakni isolat bakteri digoreskan pada *blood agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48-72 jam. Apabila terdapat zona bening menandakan bakteri tersebut memiliki aktivitas biosurfaktan. Adapun tipe zona bening yang dihasilkan yaitu α -hemolisis zona bening berwarna kehijauan, β -hemolisis zona bening

berwarna putih dan γ -hemolisis ketika tidak ada perubahan dalam medium di sekitar koloni bakteri. Darah kuda dalam penelitian ini diperoleh dari industri Biofarma dalam keadaan segar. Darah kuda ditambahkan ke media *blood base* agar sebanyak 7% (Woelansari, 2016).

B. Uji *Oil Spreading*

Proses ini berdasar pada (Walter *et al.*, 2010), yakni minyak kelapa dipipet sebanyak 10 μ L kemudian ditambahkan aquades steril 40 mL pada cawan petri. Selanjutnya, ditambahkan 10 μ L kultur bakteri di tengah lapisan minyak. Apabila menghasilkan zona bening menandakan adanya aktivitas biosurfaktan. Zona bening ini berkolerasi dengan aktivitas surfaktan.

3.3.3 Uji Aktivitas Biosurfaktan

Proses ini berdasar pada (Sari *et al.*, 2015), yakni suspensi bakteri uji diperoleh dari stok yang masih segar yang berisi media NB diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang (25-30°C). Kemudian 1 mL suspensi bakteri diinokulasikan ke 100 mL labu erlenmeyer mengandung 3,3 mL minyak kelapa sebagai sumber substrat. Selanjutnya kultur bakteri dituang 20 mL pada masing-masing tabung valkon 50 mL (diberi label T0, T1, T3, T5, T7 tiap isolat bakteri) dan ditumbuhkan secara aerobik selama 7 hari dengan pengocokan konstan (*shaker*) pada suhu ruang. Setiap pengambilan sampel, misalnya pada T0 dilakukan pengujian aktivitas biosurfaktan menggunakan metode emulsifikasi. Proses ini berdasar pada (Saravanan & Vijayakumar, 2012), yaitu kultur bakteri dalam media NB diambil 2 mL lalu ditambahkan 2 mL minyak kelapa. Kemudian campuran tersebut divortex kecepatan tinggi selama 2 menit dan dibiarkan selama 24 jam. Selanjutnya dihitung indeks emulsi yaitu:

$$\text{Indeks Emulsifikasi (E}_{24}\text{)} = \frac{\text{tinggi emulsi}}{\text{tinggi total}} \times 100\%$$

Lakukan hal yang sama untuk hari selanjutnya pada masing-masing bakteri. Kultur bakteri setelah difermentasi, dipisahkan antara sel dengan supernatan dengan cara sentrifugasi 3600 rpm selama 20 menit. Supernatan diuji menggunakan kromatografi lapis tipis dan uji antibakteri.

3.3.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Proses ini berdasar pada (Das *et al.*, 2009) yaitu biosurfaktan dilakukan uji kromatografi lapis tipis menggunakan eluen kloroform: metanol: air dengan perbandingan 65: 25: 4. Pelat KLT berukuran 4x5 cm, diukur batas atas dan bawah masing-masing 0,5 cm. Kemudian pelat KLT ditotolkan biosurfaktan 3-4 totolan dengan pipa kapiler lalu diamati pada lampu UV jika sudah berpendar, maka pelat siap dipakai. Apabila chamber yang berisi eluen sudah jenuh, dimasukkan pelat KLT tersebut dalam chamber dan ditunggu hingga terelusi sampai tanda batas. Hasil KLT diamati pada lampu UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian disemprot dengan reagen ninhidrin (250 mg dalam 50 mL aseton) lalu dipanaskan menggunakan oven pada suhu 121°C selama ± 3 menit dan diamati secara visual.

3.3.5 Uji Aktivitas Antimikroba

Proses ini berdasar pada (Sari *et al.*, 2015) yakni metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode difusi agar. Kultur bakteri dipindahkan ke media miring NA secara aseptis dan diinkubasi 24 jam. Kemudian subkultur bakteri dibiakkan ke dalam media NB secara aseptis dan diinkubasi selama 16-18 jam. Selanjutnya subkultur bakteri dalam media cair diukur % transmittan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Panjang gelombang bakteri *Escherichia coli* yaitu 620 nm dan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 595 nm (Purnomohadi, 2010). Kemudian media MHA dituang ke masing-masing cawan petri 15-20 mL dan ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 mL dibiarkan memadat. Kertas cakram berisi 20 μ L biosurfaktan diletakkan di atas lapisan agar yang telah memadat.

Kontrol positif menggunakan kapsul kloramfenikol 250 mg. Satu kapsul kloramfenikol dibuka cangkangnya dan ditimbang serbuk dalam kapsul sebanyak 30 mg. Selanjutnya serbuk dilarutkan dalam metanol 5 mL untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol 250 μ g/50 μ L (Wewengkang *et al.*, 2014). Kertas cakram berisi 20 μ L kloramfenikol diletakkan di atas lapisan agar yang telah memadat. Kontrol negatif menggunakan pelarut kloramfenikol yang diteteskan pada kertas cakram. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram.