

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi : - Pengambilan sampel sedimen lumpur di muara Sungai Banjir Kanal Timur, Semarang.

- Isolasi dan karakterisasi bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Biologi FMIPA Universitas Diponegoro.

- Analisis kandungan logam berat di Laboratorium Kimia Analitik Kimia Murni FMIPA Universitas Diponegoro.

Waktu penelitian diadakan pada bulan Juli - September 1995.

B. Bahan dan Alat.

B.1. Alat

- waskom
- termos es
- plastik
- centong plastik
- "dredge"
- rak tabung reaksi
- tabung reaksi
- pembakar spiritus
- neraca
- aluminium foil
- kapas
- batang pengaduk

- sendok plastik
- ose ujung tumpul
- pipet
- mikroskop
- gelas penutup
- gelas benda
- gelas benda dengan cekungan tunggal
- tabung Durham
- tabung reaksi
- cawan petri
- seperangkat alat Atomic Absorption Spectrofotometer Flame
- kertas grafik
- spektrofotometer - spectronik 20
- tabung "cuvette"

B.2. Bahan

- alkohol
- sampel lumpur
- air pepton
- medium Salt Base Solution (SBS) cair
- medium Salt Base Solution (SBS) cair + gliserol
- medium Salt Base Solution (SBS) agar + gliserol
- larutan Gram A
- larutan Gram B
- larutan Gram C
- larutan Gram D
- biakan murni isolat bakteri

- aquades
- alkohol
- larutan Klein A, B, C
- vaselin
- indikator biru bromtimol
- medium laktosa, glukosa, fruktosa, sukrosa cair
- Gram's iodine
- reagen kovac
- larutan H_2O_2 3%
- reagen tetrametil-p-fenilenediamin dehidroksi clorida
- isolat bakteri dalam bentuk pasta
- isolat bakteri dalam medium SBS cair + $Pb(NO_3)_2$ 0,03 ppm
- isolat bakteri dalam medium SBS cair + $Pb(NO_3)_2$ 0,05 ppm
- isolat bakteri dalam medium (SBS) cair + $Pb(NO_3)_2$ 0,1 ppm

C. Cara Kerja

C.1. Pengambilan Sampel

Dilakukan pengambilan sampel lumpur dengan "dredge" di muara Sungai Banjir Kanal Timur pada tiga tempat yang berbeda, kemudian dimasukkan dalam waskom. Masing-masing sampel lumpur diambil pada bagian atas dengan centong plastik dijadikan satu dalam kantong plastik. Sampel tersebut kemudian

dimasukkan ke dalam termos es. Salinitas dan pH perairan di sekitar muara diukur dengan menggunakan refraktosalinometer dan menggunakan pH meter.

C.2. Isolasi Bakteri

Sebanyak 1 gr sampel lumpur, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi SBS cair 9 ml dengan menggunakan ujung batang pengaduk, lalu ditutup dengan kapas. Kemudian digojog supaya homogen dan diberi label. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam kemudian diambil 1 ml suspensi sampel dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air pepton. Suspensi sampel dalam air pepton lalu digojog agar homogen, suspensi ini konsentrasinya 10^{-2} . Dari tabung yang berisi suspensi dengan konsentrasi 10^{-2} diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung yang berisi 9 ml air pepton. Dengan demikian suspensi yang dihasilkan ini adalah konsentrasi 10^{-3} . Demikian seterusnya sampai dengan konsentrasi 10^{-10} . Setiap pengenceran ditanam dengan metode taburan pada cawan petri secara duplo yang berisi medium SBS agar dan gliserol. Diinkubasi 24 - 48 jam pada suhu kamar. Koloni yang tumbuh pada medium agar tersebut diamati dibawah mikroskop. Setiap koloni yang berbeda dipindah ke dalam tabung reaksi yang berisi 3 ml medium cair + gliserol. Diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Tiap koloni dilakukan pengecatan Gram sebagai berikut :

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 95%,

kemudian ditetesi suspensi bakteri. Difiksasi diatas lampu spirtus, selanjutnya ditetesi gram A selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan keringkanginkan. Ditetesi gram B selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Ditetesi gram C selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Ditetesi gram D selama 2 menit dicuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Diamati dibawah mikroskop dan digambar.

Jika bentuk sel masih bermacam-macam dilakukan taburan lagi untuk tiap koloni dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar, hingga diperoleh isolat-isolat yang murni.

C.3. Karakterisasi Isolat Bakteri

a. Pengamatan Motilitas Isolat Bakteri Dengan Cara Hanging Drop

Gelas benda dan penutupnya dibersihkan dengan alkohol kemudian dipanggang di atas lampu spirtus. Satu ose isolat diambil dan di campur dengan sedikit aquades. Suspensi isolat diambil secara aseptis, diletakkan di atas gelas penutup. Selanjutnya ditetaskan vaselin pada empat sudut tepi cekungan gelas benda dan ditutupkan pada gelas benda penutup dengan menempatkan suspensi biakan isolat di lubang cekungan. Setelah rapat kemudian dibalik sehingga posisi menjadi

menggantung pada gelas penutup (Salle, 1973). Hasil pengamatannya digambar baik bentuk atau adanya gerakan bakteri.

b. Pengecatan Spora Bakteri

Satu ose suspensi isolat diletakkan pada gelas benda yang bersih kemudian difiksasi. Ditetaskan larutan Klein A lalu dipanaskan sampai nampak uap namun tidak mendidih, didiamkan selama 5 menit lalu dicuci dengan air mengalir. Ditetaskan dengan larutan Klein B sampai warna cat luntur, kemudian dicuci dengan air mengalir. Ditetaskan larutan Klein C dan didiamkan selama 2 menit, kemudian dikeringanginkan. Setelah itu diamati dan digambar mengenai letak spora, bentuk spora, dan ukuran terhadap sel bakteri. Hasil pengecatan spora akan terlihat berwarna hijau, sel berwarna merah.

c. Pengujian Karakter Biokimia Isolat Bakteri

1. Fermentasi Karbohidrat

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan ke dalam satu seri medium (glukosa, sukrosa, dan fruktosa). Sebagai kontrol dibiarkan satu seri medium tidak diinokulasi dengan isolat bakteri. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 36° C, selama 48 jam. Dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan dan perubahan yang terjadi pada medium.

2. Uji Katalase

Teteskan beberapa tetes larutan H_2O_2 di atas gelas benda yang bersih, kemudian diambil sedikit biakan murni isolat bakteri dan letakkan di dalam tetesan H_2O_2 . Diamati terjadinya gelembung-gelembung udara di dalam tetesan H_2O_2 .

3. Uji Oksidase

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair nutrien dan satu tabung sebagai kontrol. Diinkubasikan pada suhu $33^\circ C$ selama 24 jam. Setelah itu teteskan 0,2 ml larutan alpha-naphtol 1% dan 0,3 ml larutan p-aminodimethylalanin-oxalat 1% ke dalam tabung biakan, kemudian dikocok selama 5 menit, amati terjadinya warna biru yang menunjukkan adanya enzim oksidase. Bandingkan dengan kontrol.

4. Uji Reduksi Nitrat

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium kaldu nitrat. Diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Selanjutnya diteteskan dua tetes asam sulfanilat dan 2 tetes larutan dimetil alfa naftilamin. Diamati terjadinya perubahan warna merah pada medium yang menunjukkan adanya reduksi nitrat.

C.4. Pengukuran Kandungan Logam Berat Pb Pada Sampel Lumpur Dengan Metode AAS Flame

Sampel lumpur sebanyak 200 mg dalam gelas piala 250 ml ditambahkan 15 ml aquaregia, dipanaskan di atas "hotplate" sampai bercak-bercak. Selanjutnya ditambahkan HNO_3 10 ml, dipanaskan sampai semua garam Pb nya larut dan diencerkan dengan air, kemudian dipanaskan. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, kemudian diambil dengan pipet sebanyak 5 ml larutan tadi dalam labu ukur 100 ml dan siap dianalisa dengan AAS. Hal yang sama juga dikerjakan pada blanko.

C.5. Pengukuran Pertumbuhan Isolat Bakteri Pengikat Logam Berat Pb

Dibuat starter dari tiap-tiap isolat bakteri yang akan diukur pertumbuhannya dengan cara menginkubasikan isolat bakteri ke dalam 50 ml medium SBS cair + gliserol, inkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar. Suspensi yang didapatkan diukur densitas optiknya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Dari hasil inkubasi diambil 1 cc ditanam dengan cara taburan pada cawan petri yang berisi SBS agar + gliserol dan dibuat duplo, diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar kemudian dihitung jumlah koloninya. Setelah itu disesuaikan hasil pengukuran densitas optiknya dengan hasil hitungan pada cawan petri. Sisa starter biakan murni isolat bakteri sebanyak 20% (v/v) masukkan ke dalam 75 ml SBS cair + gliserol + logam $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dengan konsentrasi 0,03

ppm; 0,05 ppm; 0,1 ppm dan medium tanpa penambahan logam. Digojok pada suhu kamar dan setiap 4 jam diamati optical densitasnya pada panjang gelombang 660 nm selama 40 jam. Diseleksi isolat yang punya kurva pertumbuhan terbaik.

C.6. Pengukuran Kandungan Logam berat Pb pada Isolat Bakteri Dengan Metode AAS Flame

Stok biakan murni isolat bakteri inokulasikan pada 250 ml SBS cair + gliserol + logam $Pb(NO_3)_2$ dengan konsentrasi 0,03 ppm; 0,05 ppm; 0,1 ppm dan medium tanpa penambahan logam. Sheaker pada suhu kamar selama 24 - 48 jam. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pasta sel yang diperoleh dicuci dengan NaCl 0,9% steril, sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dicuci lagi dengan NaCl 0,9% steril, sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pasta sel kemudian diukur kandungan logam beratnya dengan metode AAS flame

D. Metode Analisa Data

Dalam percobaan ini, data yang diperoleh akan diolah dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial yang akan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Faktor pertama adalah isolat mikrobial sedangkan faktor yang kedua konsentrasi $Pb(NO_3)_2$. Ulangan sebanyak 3 kali.