

IV. METODE PENELITIAN

A. Tempat Penelitian

1. Tempat pengambilan sampel.

Pengambilan sampel dilakukan di kolam pembuangan limbah pabrik obat 'P' di Semarang.

2. Analisis laboratorium.

Analisis laboratorium dilakukan di Laboratorium Mikro-Bio-Genetika, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Diponegoro Semarang.

B. Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Desember 1995, dan analisis laboratorium dilaksanakan pada bulan Desember 1995 - Juni 1996.

C. Bahan dan Alat Penelitian.

1. Bahan Penelitian.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel limbah cair yang tercemar fenol; larutan Gram A (larutan cat Hucker's Crystal Violet); larutan Gram B (mordan JKJ); larutan Gram C (alkohol-aceton); larutan Gram D (larutan cat penutup Safranin); akuades; spiritus; kapas; medium Cetrimide Agar (Difco); larutan H_2O_2 3%; medium OF Hugh and Leifson's (2 g pepton, 5 g NaCl, 0,3 g K_2HPO_4 , 3 g agar, 15 ml bromthymol blue 2%, karbohidrat, 1

liter akuades); medium Nutrien Agar(Difco); medium motilitas (80 g gelatin, Nutrien Agar, akuades); medium glukosa cair (50 ml larutan 20% glukosa, Nutrien Cair 950 ml); medium mineral dengan fenol konsentrasi 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,3 mg/l (fenol, 1 gr K_2HPO_4 , 1 g NH_4NO_3 , 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 $MgSO_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl, 0,02 g $CaCl_2$, 0,02 g $FeSO_4$, 10 ml "Wolfe's mineral solution", 1 liter akuades); larutan Amonium hidroksida (35 ml NH_4OH 0,5 N dalam 1 liter air); larutan buffer fosfat (pH 6,8); larutan 4-aminoantipirin 2%; larutan $K_3Fe(CN)_6$ 8%.

2. Alat Penelitian.

Dalam penelitian ini dibutuhkan berbagai macam alat yang meliputi botol sampel, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, rak tabung reaksi, bunsen, ose, autoklaf, inkubator, gelas benda, Spectronic 20.

D. Metode Penelitian.

1. Isolasi

Sampel air limbah yang mengandung fenol diambil secara aseptis menggunakan botol sampel steril.

Sampel diencerkan dengan pengenceran 10X, 100X, 1000X. Dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml, kemudian diinokulasikan dengan cara taburan ke dalam cawan petri yang berisi medium Cetrimide Agar. Inkubasi dilakukan selama 2 hari pada suhu 300 °C. Koloni yang terbentuk selama masa inkubasi diisolasi dan dimurnikan kembali pada medium

Cetrimide Agar dengan metode goresan (Bergan, 1981). Isolat murni selanjutnya dibiakkan pada medium Nutrien Agar miring.

2. Karakterisasi

Tahap karakterisasi ini meliputi pengujian baik pengujian sifat morfologi maupun sifat fisiologi.

Uji Bentuk Morfologi Sel. Dilakukan dengan pengecatan Gram. Gelas benda diberi sedikit akuades steril kemudian diberi satu ose biakan secara aseptis. Suspensi yang terjadi diratakan sehingga terbentuk lapisan tipis dan dikeringanginkan. Setelah kering difiksasi di atas nyala lampu spiritus, dibiarkan sampai dingin. Setelah dingin ditetesi larutan Gram A sebanyak 2-3 tetes, dibiarkan selama setengah menit, kemudian dicuci dengan air mengalir, dibiarkan sampai kering. Setelah kering ditetesi larutan mordan (Gram B) dan dibiarkan selama setengah menit, dicuci dengan air mengalir, dibiarkan sampai kering. Kemudian ditetesi Gram C, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah kering ditetesi dengan Gram D dibiarkan selama setengah menit. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat. Bakteri Gram positif tampak berwarna ungu sedang bakteri Gram negatif tampak berwarna merah (Cowan, 1975).

Uji Motilitas. Biakan isolat dinokulasikan pada medium gelatin dengan cara tusukan. Diinkubasi selama 24 jam. Diamati pertumbuhan dan adanya motilitas bakteri (Cowan, 1975).

Uji Produksi Katalase. Satu ose biakan dimasukkan ke dalam tetesan H_2O_2 3% di atas gelas benda. Gelembung-gelembung pada biakan menunjukkan uji positif (Cowan, 1975).

Uji Oksidatif/Fermentatif. Biakan diinokulasikan ke dalam dua tabung medium Hugh and Leifson's secara tusukan. Satu tabung dituangi dengan parafin cair, sedangkan yang lain dibiarkan. Kedua tabung diinkubasi selama 48 jam. Jika terjadi perubahan warna medium pada tabung yang tidak dituangi parafin dari hijau menjadi kuning dan pada tabung yang dituangi parafin cair medium tetap hijau berarti biakan bersifat oksidatif. Apabila pada kedua tabung terjadi perubahan warna medium menjadi kuning berarti biakan bersifat fermentatif (Cowan, 1975).

Uji Pertumbuhan Anaerob. Biakan diinokulasikan ke dalam medium Nutrien Agar miring. Kemudian dimasukkan ke dalam Anaerobic Jar dan diinkubasi selama 24 jam. Diamati adanya pertumbuhan biakan.

Uji Produksi Asam dari Glukosa. Biakan dinokulasikan ke dalam medium Glukosa Cair dengan indikator merah fenol. diinkubasi pada suhu 350 °C selama 48 jam. Bila warna medium berubah menjadi kuning berarti biakan membentuk asam dari fermentasi glukosa (Cowan, 1975).

3. Uji Fenol Sebagai Sumber Karbon.

Biakan ditumbuhkan pada medium Mineral dengan Fenol, dan sebagai kontrol digunakan medium Mineral tanpa Fenol. Diinkubasi pada suhu kamar

selama 20 jam. Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan mengukur peningkatan nilai kerapatan optis kultur.

4. Biodegradasi Fenol.

Pembuatan Starter

Ke dalam medium Mineral dengan Fenol diinokulasikan biakan isolat bakteri, diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Kerapatan suspensi (OD) starter yang digunakan adalah 0,5 pada panjang gelombang 640 nm.

Pengujian Kemampuan Biodegradasi

Disediakan Medium Mineral dengan Fenol dengan tiga konsentrasi fenol yang berbeda yaitu 0,1 mg/l (A), 0,2 mg/l (B) dan 0,3 mg/l (C). Masing-masing dengan tiga kali ulangan. Kedalam setiap erlenmeyer, diinokulasikan inokulum dari starter sebanyak 2% (v/v). Setiap dua jam diamati pertumbuhan bakteri dengan mengukur kerapatan optis suspensi pada panjang gelombang 640 nm.

Konsentrasi fenol diukur dengan metode "Direct Photometri" (Greenberg *et al*, 1992), dengan cara sebagai berikut: disiapkan 100ml air suling sebagai blanko; disiapkan 0,1 mg fenol dalam 100 ml air sebagai standar dan sampel 100 ml. Sampel, blanko dan larutan standar masing-masing ditambah 2,5 ml 0,5 N NH_4OH dan pH disesuaikan menjadi $7,9 \pm 0,1$ dengan fosfat buffer (pH 6,8). Ditambahkan 1 ml larutan 2% 4-aminoantipirin, digojog. Ditambahkan 1 ml larutan 8% $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ digojog baik-baik. Setelah 15 menit dipindah ke cuvet dan dibaca pada panjang gelombang 500 nm.

Untuk mengetahui kadar fenol, maka absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer dimasukkan pada rumus berikut ini:

$$\text{mg fenol/liter} = \frac{C \times D \times 1000}{E \times B}$$

C = mg larutan fenol standar

D = absorbansi sampel

E = absorbansi larutan fenol standar

B = ml sampel

E. Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap faktorial. Faktor pertama adalah kadar fenol terdiri dari tiga taraf yaitu: 0,1 mg/l (F1), 0,2 mg/l (F2) dan 0,3 mg/l (F3). Sedang faktor kedua adalah masa inkubasi yang terdiri dari 11 taraf yaitu: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 jam. Masing-masing dengan tiga kali ulangan.

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji F, kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Selain itu data juga dianalisis dengan regresi dan korelasi.