

BAB IV METODOLOGI

A. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

1. Tempat penelitian : Laboratorium Mikro-Bio-Genetika
Universitas Diponegoro Semarang
Laboratorium Kimia Dasar Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
2. Waktu penelitian : Juni - Oktober 1996
3. Lokasi : Pelabuhan Tanjung Emas Semarang

B. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan : Sampel air laut yang tercemar bahan bakar minyak, medium selektif untuk bakteri minyak (750 ml air laut, 250 ml aquadest, 0,5 gr NH_4Cl , 0,5 gr K_2HPO_4 , 1 gr Na_2HPO_4 , 1 tetes minyak, pH 7,6), medium TSA (Trypticase Soy Agar), medium Hugh dan Leifson (2 gr pepton, 5 gr NaCl , 0,3 gr K_2HPO_4 , 3 gr agar, 1000 ml aquadest, Bromthymol 0,2 %, 15 ml), medium gelatin (4 gr gelatin, 50 ml aquadest, 1000 ml nutrien agar), medium glukosa (glukosa 20% dalam aquadest 50 ml, nutrien broth 950 ml), cat gram A, B, C, D, alkohol, aquadest steril, Indikator phenol merah, larutan H_2O_2 , larutan dimetil-p-fenil

diamin hidroklorida, NaCl 0,9 %, parafin cair, minyak pelumas.

2. Alat :

Cawan petri, Tabung reaksi, Tabung Durham, Botol sampel, Jarum ose, Pipet ukur, Erlenmeyer, Inkubator, kapas steril, Pipet, Mikroskop, Gelas benda, Gelas penutup, Spektrometri GC, lampu spiritus, autoklaf, oven, pH meter.

C. CARA KERJA

1. Cara pengambilan sampel dan isolasi

1.1. Pengambilan sampel :

Dicari permukaan laut yang terlihat adanya pencemaran minyak. Dengan menggunakan botol steril 100 ml diambil air laut dekat permukaan (± 10 cm di bawah permukaan) secara aseptis. Botol diisi lebih kurang $\frac{2}{3}$ bagian. Botol ditutup dan dikocok hingga homogen. Dimasukkan ke dalam termos es dan dibawa ke laboratorium.

1.2. Isolasi dengan metode taburan :

Dari masing-masing sampel dibuat pengenceran sampai konsentrasi 10^{-8} . Suspensi-suspensi yang dikehendaki dituang sebanyak 1 ml secara aseptis pada cawan petri secara duplo. Medium selektif agar (mengandung 1 tetes minyak) diencerkan pada pemanas air dan didinginkan pada suhu 50°C . Medium dituang

secara aseptis ke dalam cawan petri dan digoyang hati-hati supaya suspensi sampel tercampur dengan medium. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 7-14 hari. Diamati pertumbuhan koloni pada permukaan medium. Dilakukan isolasi terhadap tiap koloni yang tampak berbeda. Isolat yang berbeda dengan jarum ose kemudian digoreskan pada medium selektif agar, dalam cawan petri sehingga diperoleh koloni yang benar-benar homogen.

Dilakukan pengecatan Gram dengan cara sebagai berikut :

Diambil 1 ose biakan yang akan diperiksa dan diletakkan pada gelas benda yang steril, kemudian diratakan dengan 1 ose aquades. Dilakukan fiksasi dengan lampu spiritus. Setelah dingin dibubuhkan cat utama (Gram A) 2 - 5 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringanginkan. Ditetesi dengan larutan mordan (Gram B) dan dibiarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, dikeringanginkan. Dibubuhi larutan peluntur (Gram C) selama 30 detik, cuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Diberi larutan penutup (Gram D) selama 2 menit, cuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Diamati di bawah mikroskop dan digambar (Hadioetomo, 1985).

Jika bentuk sel belum seragam dilakukan metode taburan untuk tiap koloni yang berbeda, hingga

diperoleh bentuk koloni bakteri yang murni. Koloni bakteri ini selanjutnya disebut dengan isolat bakteri dan berikutnya dilakukan pengujian-pengujian.

2. Pengujian isolat bakteri

Pengujian terhadap isolat-isolat bakteri yang ditemukan bertujuan untuk identifikasi yang meliputi :

2.1. Uji Motilitas

Diinokulasikan kultur bakteri pada medium agar tegak gelatin pada tabung reaksi. Diinkubasi pada suhu 37°C , diamati pertumbuhan bakteri setelah 24 jam (Cowan dan Steels, 1975).

2.2. Uji fermentatif/oksidatif

Diinokulasikan kultur bakteri pada medium agar tegak Hugh dan Leifson pada tabung reaksi. Satu seri tabung ditutup dengan parafin cair dan satu seri tabung dibiarkan saja. Tiap satu koloni bakteri, diinokulasikan pada 2 seri tabung. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam. Medium ini juga digunakan untuk menguji pertumbuhan aerob/anaerob (Cowan dan Steels, 1975).

2.3. Uji katalase

Menyiapkan kultur bakteri yang berumur 24 jam. Diteteskan beberapa tetes larutan H_2O_2 di atas gelas benda yang bersih. Diambil sedikit biakan bakteri dari kultur murni dan diletakkan dalam tetesan H_2O_2 . Diamati terjadi atau tidak gelembung-gelembung udara di dalam tetesan H_2O_2 (Hadioetomo, 1985).

2.4. Uji Oksidase

Diinokulasikan bakteri dari kultur murni ke dalam medium Trypticase Soy Agar pada cawan petri secara goresan. Satu medium dibiarkan tidak diinokulasi sebagai kontrol. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri digenangi dengan reagen uji oksidase (larutan dimetil-p- fenil diamin hidrokloride 1%). Uji positif ditandai dengan berubahnya koloni menjadi merah muda, lalu merah tua, merah gelap dan akhirnya hitam (Hadioetomo, 1985).

2.5. Uji Fermentasi glukosa

Diinokulasikan bakteri dari kultur murni ke dalam medium kaldu glukosa dengan indikator merah fenol (medium telah dilengkapi dengan tabung durham). Diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37°C. Diamati perubahan warna pada medium dan terbentuknya gas pada tabung durham. (Hadioetomo, 1985)

3. Pengukuran pertumbuhan isolat bakteri

Tujuan pengukuran pertumbuhan ini untuk mengetahui kurva pertumbuhan isolat-isolat bakteri, dengan mengamati absorpsi (OD) setiap 4 jam.

Pada pengukuran kurva pertumbuhan isolat dilakukan sebanyak tiga perlakuan dan kontrol.

Medium yang digunakan yaitu selektif cair (tanpa minyak) terdiri dari :

- A : Medium dengan konsentrasi minyak 10 ppm.
- B : Medium dengan konsentrasi minyak 30 ppm.
- C : Medium dengan konsentrasi minyak 70 ppm.
- K : Medium tanpa minyak.

Dibuat starter dari tiap-tiap isolat bakteri yang akan diukur pertumbuhannya dengan cara :

Diinokulasikan isolat bakteri ke dalam 50 ml medium selektif cair untuk perlakuan dan kontrol, digojog selama 24 jam pada suhu kamar. suspensi yang didapatkan diukur OD ('optical density')/absorbansi dengan spektrofotometer. Starter yang digunakan adalah yang memenuhi persyaratan : $OD \geq 0,5$ dengan panjang gelombang 640 nm. Sisa starter biakan murni isolat bakteri sebanyak 20 ml di masukkan ke dalam 180 ml medium selektif cair untuk perlakuan dan kontrol. Digojog pada suhu kamar dan tiap 4 jam diamati 'optical density'nya pada panjang gelombang 640 nm selama 40 jam. (Hadioetomo, 1985).

4. Pengukuran kandungan minyak

Tujuan pengukuran ini untuk mengetahui pengurangan konsentrasi minyak pada medium.

Isolat biakan murni bakteri dimasukkan ke dalam medium selektif cair. Digojog pada suhu kamar selama 24 jam. Disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh dicuci 2 kali dengan garam fisiologis steril. Caranya : endapan diberi NaCl 0,9% steril kemudian digojog dengan pipet

dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh diberi NaCl 0,9% dan disentrifugasi lagi. Endapan yang diperoleh dipanen sebagai pasta sel. Untuk penyimpanan pasta sel diberi sedikit NaCl 0,9% steril. Diukur konsentrasi minyak pada pasta sel dan sisa medium dengan menggunakan spektrofotometri Gas Chromatography.

