

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

##### A.1. Tempat Penelitian

Pengambilan sampel air dilakukan di perairan Pelabuhan Tanjung Emas Semarang. Isolasi dan karakterisasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNDIP dan di Balai Laboratorium Kesehatan Semarang, sedangkan analisa konsentrasi minyak di Laboratorium Analisa Kimia Fisika Pusat UGM.

##### A.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April 1996 sampai bulan Mei 1997

#### B. Bahan dan Alat Penelitian

##### B.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah contoh air yang tercemar minyak dari perairan Pelabuhan Tanjung Emas Semarang, alkohol 95%, akuades, Marine Agar (Difco), medium selektif (Gunkel, 1967; air laut 750 ml,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 gr,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 gr,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,25gr, akuades 250 ml), larutan Gram A (larutan cat Hucker's Crystal Violet), larutan Gram B (mordan JKJ), larutan Gram C

(alkohol - acetone), larutan Gram D (larutan cat penutup Safranin), vaselin, medium glukosa cair, indikator Fenol Merah, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, minyak imersi, minyak solar, larutan garam fisiologis, "gas generating kit" tipe BR 38 (Oxoid).

## B.2. Alat Penelitian

Dalam penelitian ini dibutuhkan berbagai macam alat penelitian yang meliputi, botol sampel, kertas pH, termos es, batang indikator uji oksidase tipe BR 64 (Oxoid), botol plastik 50 ml, tabung reaksi, lampu spiritus, sendok plastik, ose ujung tumpul, ose ujung runcing, neraca, kapas, cawan petri, pipet ukur, pipet tetes, gelas benda, gelas penutup, gelas benda dengan cekungan tunggal, mikroskop, tabung Durham, labu Erlenmeyer, autoklaf, oven, "shaker", inkubator, spektrofotometer Spectronic 20, tabung cuvet spektrofotometer, sentrifuge, tabung centrifuge, "hot plate", labu ukur, "Oil Content Meter" POC - 100, Anaerobic Jar, spet 0,5 cc syringe.

## C. Cara Kerja

### C.1. Pengambilan Contoh Air

Ditentukan secara "purposive" tiga lokasi pengambilan contoh berdasarkan pengamatan visual yaitu

dipilih lokasi yang tercemar minyak. Pada tiap lokasi dilakukan sekali pengambilan contoh air dengan menggunakan botol sampel. Botol contoh dimasukkan ke dalam air sedalam  $\pm 10$  cm kemudian tutup botol dibuka di dalam air, setelah penuh, botol ditutup rapat dan dimasukkan dalam thermos es. Sebelumnya tiap botol contoh diberi label stasiun pengambilan.

### C.2. Isolasi Bakteri

Medium selektif dibuat dengan mencampurkan air laut 750 ml, akuades 250 ml,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 gr,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 gr,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,25 gr pH diatur 7,6. Untuk medium selektif agar ditambah minyak 1 tetes dan agar 1,5-2 % sedangkan untuk medium selektif cair untuk perlakuan tidak ditambah agar tetapi ditambah minyak solar sesuai konsentrasi perlakuan.

Dari masing-masing contoh air laut yang diambil, dibuat pengenceran sampai konsentrasi  $10^{-8}$ . Suspensi - suspensi yang dikehendaki dituang sebanyak 1 ml secara aseptis pada cawan petri secara duplo. Medium selektif agar diencerkan pada pemanas air dan didinginkan sampai suhu  $50^\circ\text{C}$ . Medium dituang secara aseptis ke dalam cawan petri dan digoyang hati-hati supaya suspensi contoh tercampur dengan medium. Diinkubasi 7-14 hari pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Koloni yang tumbuh diamati perbedaannya

berdasarkan besar kecilnya koloni, bentuk koloni, elevasi permukaan koloni, tekstur koloni, warna koloni dan kepekatan koloni. Tiap koloni yang berbeda dipindah ke dalam medium miring Marine Agar, setelah itu diinkubasi pada suhu 28<sup>o</sup> C selama 24 jam. Tiap koloni dilakukan pengecatan Gram.

Pengecatan Gram . Dilakukan dengan cara : Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 95% dan difiksasi dengan cara dipanaskan di atas lampu spiritus. Diberi 1 tetes akuades steril, ditambah 1 ose isolat dan disuspensikan kemudian difiksasi di atas lampu spiritus. Ditetesi Gram A 1-2 tetes dan ditunggu selama 1 menit. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Ditetesi dengan Gram B dan ditunggu selama 2 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Setelah itu ditetesi dengan Gram C selama 30 detik atau sampai zat warna ungu kristal tidak terlihat lagi mengalir dari gelas benda. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Yang terakhir, ditetesi Gram D selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan (Hadioetomo, 1993).

Selanjutnya diamati dengan mikroskop perbesaran kuat. Jika bentuk sel yang diamati di bawah mikroskop masih bermacam-macam, maka dilakukan metode gores.

Inokulum digoreskan di permukaan medium Marine Agar dalam cawan petri dengan ose tumpul. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 28° C. Setelah inkubasi pada garis-garis goresan akan terdapat koloni-koloni bakteri yang terpisah. Koloni yang tumbuh di luar garis goresan adalah kontaminan. Kemudian dilakukan pengecatan Gram pada koloni yang tumbuh pada garis goresan apabila bentuk sel telah seragam, dipindahkan ke dalam medium Marine Agar dan didapatkan kultur murni.

### C.3. Karakterisasi Isolat Bakteri Gram Positif Pemecah Minyak (Berdasarkan Cowan dan Steel, 1975)

#### Pengamatan Motilitas Bakteri Dengan Cara Hanging

Drop . Gelas benda cekung dan penutupnya dibersihkan dengan alkohol dan difiksasi di atas lampu spiritus. Diambil satu ose isolat bakteri dan disuspensikan dengan setetes akuades steril dan diletakkan di atas gelas penutup. Ditetaskan vaselin pada empat tepi cekungan gelas benda, kemudian gelas benda cekung ditutupkan di atas gelas penutup dengan menempatkan suspensi biakan isolat bakteri tepat di lubang cekungan. Gelas benda dan penutup yang telah berlekatan secara cepat dibalik, sehingga posisi suspensi menjadi menggantung pada gelas penutup. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat adanya gerakan bakteri.

Fermentasi Karbohidrat. Diinokulasikan isolat bakteri ke masing-masing tabung reaksi yang berisi medium glukosa cair yang telah diberi indikator Fenol Merah dan diisi dengan tabung Durham. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam dan diamati perubahan warna pada medium serta terbentuknya gas pada tabung Durham.

Uji Katalase . Ditetaskan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada gelas benda. Diambil satu ose isolat bakteri dan diletakkan pada tetesan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tersebut. Diamati terjadinya gelembung udara dalam tetesan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang menunjukkan reaksi positif.

Uji Oksidase. Ditempelkan batang indikator uji oksidase pada bagian ujung yang berwarna coklat pada koloni isolat bakteri. Diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna coklat menjadi ungu menunjukkan uji oksidase positif yang berarti bakteri mampu menghasilkan enzim oksidase.

Uji Pertumbuhan Anaerob. Diinokulasikan kedua isolat bakteri pada medium dalam cawan petri. Amplop "gas generating kit" digunting sudutnya dan ditambahkan air kedalamnya. Cawan petri yang sudah diinokulasi dengan isolat bakteri, amplop "gas generating kit" yang telah diisi air dan indikator anaerob semuanya dimasukkan ke dalam anaerob jar dan ditutup rapat.

Diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam kemudian dilihat pertumbuhan koloni dalam cawan petri.

#### C.4. Pembuatan Pola Pertumbuhan Isolat Bakteri

Biakan murni isolat diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 50 ml medium selektif cair + minyak dengan konsentrasi 10 ppm, 30 ppm, dan 70 ppm serta kontrol tanpa penambahan minyak, kemudian digojog pada suhu kamar selama 24 jam. Dengan menggunakan spektrofotometer, dilihat kerapatan optisnya (Optical Density-nya) pada panjang gelombang 660 nm. Medium yang dipakai sebagai starter adalah yang OD nya 0,5.

Masing-masing medium yang berupa 200 ml medium selektif cair + minyak dengan konsentrasi 10 ppm, 30 ppm, dan 70 ppm serta kontrol (tanpa minyak) ditambah starter sebanyak 20% (v/v). Digojog pada suhu kamar. Setiap empat jam diukur OD nya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm selama 40 jam. Setelah itu dibuat grafik pertumbuhan dengan sumbu X menunjukkan waktu dan sumbu Y menunjukkan Optical Density (OD) (Hadioetomo, 1993).

#### C.5. Pengukuran Konsentrasi Minyak Pada Filtrat dan Isolat Bakteri dengan Metode TOC

Pembuatan Pasta Sel Bakteri. Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer yang

berisi 200 ml medium selektif cair + minyak dengan konsentrasi 10 ppm, 30 ppm, dan 70 ppm serta kontrol tanpa penambahan minyak. Kemudian digojog pada suhu kamar selama 40 jam. Disentrifugasikan pada 3000 rpm selama 15 menit. Filtrat diambil dan dimasukkan dalam botol yang telah disediakan. Pasta sel dicuci dengan larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%) steril dengan cara disemprot menggunakan pipet. Disentrifugasi lagi pada 3000 rpm selama 15 menit dan pasta dicuci dengan NaCl 0,9% steril. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 3000 rpm, setelah itu pasta sel dipanen. Untuk penyimpanan pasta sel diberi sedikit NaCl 0,9% steril (Hadioetomo, 1993).

Pengukuran konsentrasi minyak. Filtrat sisa panen pasta dan pasta sel bakteri diukur konsentrasi minyaknya dengan metode Total Oil Contentmeter Untuk mengukur minyak yang telah dipecah oleh bakteri, konsentrasi minyak sebelum medium diinkubasi dikurangi konsentrasi minyak pada filtrat dan pada pasta sel dibandingkan dengan medium yang tidak diinokulasi sebagai kontrol.