

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi : - Pengukuran pertumbuhan sel mikrobial dan panen pasta bakteri di

Laboratorium Mikro-Bio-Genetika jurusan Biologi F-MIPA

Universitas Diponegoro.

- Analisis kandungan minyak di Laboratorium Analisa Kimia dan Fisika Pusat

Universitas Gajah Mada.

Waktu penelitian diadakan pada bulan Mei - Agustus 1997.

B. Bahan dan Alat

B.1. Alat

Erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pembakar spiritus, neraca, kapas, ose ujung tumpul, pipet, baker gelas, gelas ukur, 'shaker', inkubator, tabung cuvette, 'centrifuge', spektrofotometer spectronic 20, 'total oil contentmeter'.

B.2. Bahan

Biakan isolat bakteri *Pseudomonas sp* yang diisolasi dari limbah bahan bakar di laut, medium selektif (Gunkel, 1967) untuk bakteri pendegradasi minyak (air laut 750 ml, aquadest 250 ml, NH_4Cl 0,5 g, K_2HPO_4 0,5 g, Na_2HPO_4 1 g, dengan pH medium 7,6), Medium Nutrien Agar (E Merck), alkohol, bensin, oli kapal bekas, solar, air laut, larutan garam fisiologis NaCl 0,9 %.

C. Cara Kerja

C.1. Pembuatan medium

C.1.1 Medium selektif untuk bakteri pendegradasi minyak

Disiapkan 1000 ml medium selektif untuk bakteri pendegradasi minyak (air laut 750 ml, aquadest 250 ml, NH_4Cl 0,5 gr, K_2HPO_4 0,5 gr, Na_2HPO_4 1 gr dengan pH medium 7,6). Kemudian ditambah minyak yang diujikan (bensin, oli dan solar) dengan penambahan sebagai berikut :

- konsentrasi 10 ppm ditambahkan 0,01 ml
- konsentrasi 30 ppm ditambahkan 0,03 ml
- konsentrasi 70 ppm ditambahkan 0,07 ml

Setelah itu diaduk dan dibagi dalam erlenmeyer 250 ml. Masing-masing untuk starter, ulangan 1, ulangan 2, ulangan 3 dan kontrol, kemudian disterilisasi.

C.1.2 Medium Nutrien Agar miring

Ditimbang 28 gram medium NA (E. Merck), kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ditambahkan aquadest sebanyak 1 liter, kemudian diaduk dan dipanaskan. Setelah seluruhnya merata dimasukkan kedalam tabung, masing-masing \pm 8 ml. Selanjutnya tabung ditutup dengan kapas dan diletakkan miring sampai padat.

C.2. Pengukuran pertumbuhan isolat bakteri

Dibuat starter dari isolat bakteri *Pseudomonas sp* dengan cara :

Diinokulasikan isolat bakteri ke dalam 50 ml medium selektif untuk bakteri

minyak yang sudah ditambah bensin, oli kapal bekas dan solar dengan konsentrasi masing-masing 10 ppm, 30 ppm, dan 70 ppm. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Suspensi yang didapatkan diukur OD ('Optical Density') dengan spektrofotometer spectronic 20 pada panjang gelombang 640 nm. Dari hasil inkubasi diambil 1 cc ditanam pada cawan petri secara duplo diinkubasi 24 jam pada suhu kamar kemudian dihitung jumlah koloninya. Disesuaikan hasil pengukuran 'Optical Density' dengan hasil hitungan pada cawan petri. Starter yang digunakan adalah yang memenuhi persyaratan $OD > 0,5$ atau kalau dihitung 10^6 s/d 10^8 sel. Sisa starter biakan murni isolat bakteri sebesar 20 % (v/v) dimasukkan ke dalam 200 ml medium yang berisi campuran medium selektif untuk bakteri minyak dan jenis minyak dengan konsentrasi 10, 30, dan 70 ppm. Digojog pada suhu kamar dan tiap 4 jam diamati 'optical density'nya pada panjang gelombang 640 nm selama 40 jam. Dari hasil pengamatan yang diperoleh dibuat pola pertumbuhan dengan sumbu x waktu pertumbuhan sedangkan sumbu y 'optical density' (OD).

C.2. Pengukuran kandungan minyak

C.2.1. Panen pasta

Isolat biakan murni bakteri dimasukkan ke dalam 50 ml campuran medium selektif untuk bakteri minyak dengan jenis limbah minyak (bensin, oli kapal bekas dan solar) dengan konsentrasi masing-masing 10, 30, dan 70 ppm. Diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Suspensi yang didapat diukur OD dengan spektrofotometer spectronic 20. Starter yang digunakan

adalah yang memenuhi persyaratan $OD > 0,5$ atau kalau dihitung 10^6 s/d 10^8 sel. Sisa starter biakan murni isolat bakteri sebanyak 20% (v/v) dimasukkan ke dalam 200 ml campuran medium selektif untuk bakteri minyak dengan jenis limbah minyak (bensin, oli kapal bekas, dan solar) dengan konsentrasi masing-masing 10, 30, dan 70 ppm. Digojog pada suhu kamar selama 40 jam. Disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh dicuci dua kali dengan garam fisiologis. Caranya : endapan diberi NaCl 0,9 % dan disentrifugasi lagi. Endapan yang diperoleh dipanen sebagai pasta sel. Untuk penyimpanan pasta sel diberi sedikit NaCl 0,9 % steril. (Hadioetomo, 1985).

C.2.2 Pengukuran kandungan minyak

Filtrat sisa panen pasta diukur konsentrasi minyaknya. Untuk mengukur minyak yang telah didegradasi oleh bakteri adalah konsentrasi minyak sebelum medium diinkubasi dikurangi konsentrasi minyak sesudah dilakukan panen pasta. Juga diukur konsentrasi minyak pada pasta sel dibandingkan dengan medium yang tidak diinokulasi sebagai kontrol. Pengukuran konsentrasi minyak dengan menggunakan alat 'total oil contentmeter'.

D. Metode Analisa Data

Dalam percobaan ini data yang diperoleh akan diolah dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan pola faktorial yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf uji 1%. Faktor pertama adalah jenis limbah minyak sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi minyak dengan ulangan sebanyak 3 kali. Kemudian diuji adanya interaksi antara 2 faktor tersebut (Hanafiah, 1993).