

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif. Metode deskriptif adalah suatu penelitian untuk membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 1988).

#### **B. Populasi dan Sampel**

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri resisten logam krom yang terdapat dalam limbah cair pada salah satu industri penyamakan kulit Sukaregang Kabupaten Garut.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah semua bakteri yang tumbuh pada medium Luria Bertani (LB) agar yang ditambahkan krom hexavalen ( $K_2Cr_2O_7$ ) 726,2 mg/L pada cawan Petri (Camargo *et al.*, 2003).

#### **C. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret sampai dengan Juli 2011 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

#### D. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Alat-alat yang digunakan selama penelitian ini terdapat pada Tabel 3.1, sedangkan daftar bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.2.

**Tabel 3.1** Alat – alat Penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Mikroskop	22.103 BLJ070	1 unit
2.	<i>Hot plate and Magnetic stirrer</i>	Merk EYELA, RSCH – 3	1 buah
3.	<i>Autoclave</i>	Merk Hirayama Mode HC36At	1 buah
4.	<i>Vorteks</i>	Merk SIBATA	1 buah
5.	Timbangan Analitik	Merk AND, HF 300	1 buah
6.	Spatula	Logam	2 buah
7.	Cawan Petri	<i>Pyrex</i> ; $\varnothing = 9$ cm	30 buah
8.	Tabung reaksi	<i>Pyrex</i>	100 buah
9.	Lup inokulasi	P = 22,5 cm; = 5 mm	1 buah
10.	Rak tabung	-	3 buah
11.	Gelas ukur 10 ml	<i>Pyrex</i>	1 buah
12.	Gelas ukur 50 ml	<i>Pyrex</i>	1 buah
13.	Gelas ukur 1000 ml	<i>Pyrex</i>	1 buah
14.	Gelas kimia 500 ml	<i>Pyrex</i>	1 buah
15.	Gelas kimia 1000 ml	<i>Pyrex</i>	1 buah
16.	Makropipet 1 ml dan 5 ml	Merek Eppendorf	1 unit
17.	Oven	PT25.221.03.002.BM	1 unit
18.	Lemari pendingin ( <i>Freezer</i> )	PT25.221.03.021.BM	1 buah
19.	Tips 1 ml, 5 ml, 10 ml	-	50 Buah
20.	<i>Water sampler</i> 150 ml	-	3 buah

21.	<i>Cool box</i>	-	1 buah
22.	Kamera Digital	Sony Cyber-shot DSC-TX7	1 Buah
23.	Plastik tahan panas		2 bungkus
24.	Kain kasa		3 bungkus
25.	Kapas		1 bungkus
26.	Label		1 pak
27.	<i>Objek glass</i>		10 buah
28.	<i>Tissue</i>		4 gulung
29.	Kertas saring	Whatman No. 1	

**Tabel 3.2 Bahan-bahan Penelitian**

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	$K_2Cr_2O_7$	100 gr
2.	<i>Medium Luria Bertani (LB) Agar</i>	1000 ml
3.	Safranin	10 ml
4.	Kristal violet	10 ml
5.	Akuades	10 L
6.	Alkohol 96 %	500 ml
7.	Malakit hijau	30 ml
8.	Kaldu Laktosa	300 ml
9.	Kaldu Sukrosa	300 ml
10.	Kaldu Dextrosa	300 ml
11.	Phenol red	3 ml
12.	Pati agar	300 ml
13.	Lipid agar	300 ml
14.	Kertas saring	-
15.	Kasein agar	300 ml
16.	Gelatin agar	200 ml

17.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 ml
18.	<i>Urea base</i>	25 ml
19.	<i>Trypticase-nitrate broth</i>	200 ml
20.	Larutan dimethyl 1-naphthylamine	20 ml
21.	Asam sulfanilat	20 ml
22.	SIM ( <i>Sulfide Indol Motily</i> ) agar	200 ml
23.	<i>Tryptone broth</i>	200 ml
24.	Indole reagen (Kovac's reagen)	10 ml
25.	MRVP broth	100 ml
26.	Methyl red	10 ml
27.	Reagen Barritt's A	10 ml
28.	Reagen Barritt's B	10 ml
29.	Simmon's sitrat agar	200 ml

### E. Langkah Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu tahap persiapan dan tahap penelitian.

#### 1. Tahap Persiapan

##### a. Sterilisasi

Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 Lb. Kegiatan ini dilakukan di dalam Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

## 2. Tahap Penelitian

### a. Pengambilan sampel

Limbah cair diambil langsung dari saluran pembuangan limbah dari salah satu industri penyamakan kulit Sukaregang Kabupaten Garut dengan menggunakan botol gelas steril. Sampel kemudian disimpan pada suhu 4°C di dalam *ice box* untuk menahan terjadinya berbagai aktivitas biologis lalu dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI untuk dianalisis.

### b. Pengukuran Faktor Lingkungan dan Konsentrasi Logam Krom

Pengukuran faktor lingkungan yang dilakukan mencakup pH air limbah, temperatur air, dan oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen*) pada lokasi pengambilan sampel limbah krom dari salah satu industri penyamakan kulit.

Pengukuran Konsentrasi logam krom dianalisis menggunakan *Atomic Absorption Spectrofotometri* (AAS) (Triatmojo *et al.*, 2001) di laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.

### c. Pembiakan Isolat Bakteri

Sampel diencerkan terlebih dahulu menggunakan metode pengenceran, pada seri pengenceran ke-  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , dan  $10^{-6}$  sampel diambil masing-masing sebanyak 1 ml lalu digunakan untuk isolasi. Isolasi bakteri dilakukan dalam cawan Petri menggunakan medium Luria Bertani (LB) dengan optimasi pH yang berbeda-beda yaitu pH 8, pH 9 dan pH 10 dengan penambahan 1ml logam krom

( $K_2Cr_2O_7$ ) dengan konsentrasi 726,2 mg/L sesuai hasil pengukuran AAS lalu diinkubasikan pada suhu  $30^\circ C$  selama 2 hari. Penentuan suhu inkubasi dilakukan berdasarkan rata-rata suhu air limbah yang diperoleh dengan kisaran waktu dari pukul 8.00-14.00 WIB. Tahap selanjutnya, yaitu pemurnian Isolat dilakukan pada medium *Luria Bertani* (LB) agar sesuai dengan pH pertumbuhan masing-masing bakteri. Penambahan krom dilakukan secara terpisah, yaitu dengan memasukan 1 ml  $K_2Cr_2O_7$  726,2 mg/L ke dalam LB agar yang dicairkan dan didinginkan hingga  $45^\circ C$  menggunakan *tips* 1 ml steril lalu dihomogenkan menggunakan *vorteks* kemudian dimiringkan. Kegiatan tersebut dilakukan secara aseptik. Setelah itu diinkubasi pada suhu  $30^\circ C$  selama 4 hari (Camargo *et al.*, 2003).

#### **d. Pengamatan Morfologi dan Isolasi Biakan Murni Bakteri**

Pengamatan morfologi dilakukan setelah 48 jam masa inkubasi. Pengamatan morfologi bakteri merujuk kepada Cappuccino (2005), ciri morfologi koloni yang diamati mulai dari bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian. Koloni-koloni yang tumbuh pada cawan Petri merupakan biakan campuran bakteri yang tumbuh dari limbah krom. Setiap koloni dipindahkan 1 ose ke dalam cawan Petri berisi Medium *Luria Bertani* yang telah ditambahkan 1ml  $K_2Cr_2O_7$  726,2 mg/L agar diperoleh biakan murni. Hal tersebut dilakukan untuk mempermudah dalam tahap identifikasi selanjutnya.

#### **e. Pewarnaan Gram Bakteri**

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan karakteristik dan bentuk sel bakteri. Pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram. Masing-masing isolat dari kultur murni bakteri yang telah berumur 24 jam dibuat sediaan mikroskopiknya, kemudian sediaan digenangi karbol kristal violet. Setelah dibiarkan selama tiga menit, kelebihan zat warna dibuang dan ditetesi lugol hingga menggenangi sediaan selama 45-60 detik. Selanjutnya sediaan dimasukkan ke dalam *staining jar* berisi alkohol 96%, digoyang selama satu menit lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas isap. Safranin dituangkan di atas sediaan yang telah kering dan dibiarkan selama tiga menit. Setelah itu dicuci dengan aquades menggunakan botol semprot dan dikeringkan di udara. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 1000 kali. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika sel bakteri berjenis Gram positif dan berwarna merah jika berjenis Gram negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **f. Pewarnaan Endospora**

Pewarnaan Endospora dilakukan untuk memastikan karakteristik ada tidaknya endospora dan letak endospora pada sel bakteri. Dari setiap isolat murni bakteri yang telah berumur 16 jam dibuat sediaan mikroskopik, kemudian difiksasi panas, lalu ditetesi dengan larutan malakit hijau di atas sediaan mikroskopik yang telah dialasi kertas isap pada permukaan sediaan. Kegiatan tersebut dilakukan secara terus menerus selama 5 menit di atas penangas dan dijaga agar

pewarna tidak kering. Kelebihan pewarna dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, sediaan tersebut digenangi kembali dengan safranin selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir, dan dibiarkan kering. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 1000 kali. Endospora akan terlihat berwarna hijau, sedangkan sel vegetatif berwarna merah (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **g. Uji Biokimiawi**

##### **1) Uji Fermentasi Karbohidrat**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memfermentasi karbohidrat dengan menggunakan tiga jenis gula, yaitu: glukosa, laktosa dan sukrosa sebagai mediumnya yang telah ditambahkan indikator *brom cresol purple* (bcp). Cara pengujiannya adalah dengan menginokulasikan isolat ke dalam medium lalu diinkubasi selama 1-2x24 jam pada suhu 37°C. Warna kuning dan adanya gelembung/gas pada tabung Durham menunjukkan hasil yang positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

##### **2) Uji Hidrolisis Pati, Lipid, Gelatin dan Kasein**

###### **a) Hidrolisis Pati**

Hidrolisis pati menggunakan Medium Agar Pati. Pati dapat dihidrolisis oleh mikroorganisme tertentu dengan hasil akhir dekstrin. Medium Agar Pati dicairkan dalam penangas air, dinginkan suhunya sampai 45°C.



Medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Agar Pati dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan iodium/lugol diteteskan di sekitar koloni bakteri pada medium tumbuh dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika terbentuk daerah bening di sekitar koloni menandakan terjadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **b) Hidrolisis Lipid**

Hidrolisis lipid menggunakan Medium Lipid Agar. Medium Lipid Agar yang telah ditambahkan indikator *Neutral red*, dicairkan dalam penangas air, didinginkan suhunya sampai 45°C. Medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Lipid Agar dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Kemudian pertumbuhan di sekitar koloni diamati. Hasil uji hidrolisis lipid positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni dan perubahan medium lipid menjadi warna merah pada bagian bawah koloni bakteri. Hal ini disebabkan terbentuknya asam lemak mengakibatkan pH medium menurun (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **c) Hidrolisis Gelatin**

Hidrolisis Gelatin menggunakan Medium *Nutrient Gelatin*. Masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium *Nutrient Gelatin*

kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 4°C selama 30 menit. Gelatin yang telah dihidrolisis akan tetap cair meskipun disimpan pada suhu 4°C. Beberapa mikroorganisme mampu menghidrolisis gelatin karena dapat menghasilkan eksoenzim proteolitik yang disebut gelatinase (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **d) Hidrolisis Kasein**

Hidrolisis kasein menggunakan Medium Susu Skim Agar. Medium Susu Skim Agar dicairkan dalam penangas air, didinginkan suhunya sampai 45°C. Kemudian medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Susu Skim Agar dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Pertumbuhan di sekitar koloni bakteri diamati. Hasil uji hidrolisis kasein positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2005).

### **3) Uji Katalase**

Uji katalase menggunakan Medium Nutrien Agar (NA). Medium NA dicairkan dalam penangas air, dinginkan suhunya sampai 45°C. Medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium NA dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan,

larutan  $H_2O_2$  3% diteteskan di atas permukaan koloni dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika terdapat gelembung udara di atas permukaan koloni, maka mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim katalase (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **4) Uji Motilitas**

Isolat bakteri diinokulasikan pada Medium *Nutrient Agar* (NA) dengan cara stab kemudian dilihat pertumbuhannya, jika bakteri tersebut bersifat motil maka terdapat pertumbuhan di sekitar strip bakteri yang diinokulasi dan medium menjadi keruh, sedangkan apabila bakteri tidak bersifat motil maka tidak terlihat pertumbuhan sama sekali di sekitar strip dari inokulasi bakteri tersebut (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **5) Uji Produksi $H_2S$**

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium *Sulfide Indol Motily* (SIM) Agar kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ C$  selama 1-2x 24 jam. Hasil positif (terbentuknya  $H_2S$ ) ditandai dengan perubahan warna medium menjadi hitam (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **6) Uji Reduksi Nitrat**

Bakteri diinokulasikan pada tabung yang telah diberi nama mikroorganisme tersebut. Setelah itu diinkubasi pada suhu  $22-37^\circ C$  selama 24 sampai 1 x 24 jam. Kemudian medium ditetesi 3-4 tetes larutan nitrat A dan larutan B di atas

permukaan kultur, didiamkan beberapa menit kemudian lihat perubahan yang terjadi. Perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah *cherry* menunjukkan reaksi positif uji reduksi nitrat. Untuk medium yang tidak mengalami perubahan warna, selanjutnya ditambahkan *zinc powder* secukupnya, dan diamati perubahan yang terjadi. Jika terjadi perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah *cherry*, maka reaksi menunjukkan negatif dan bila tidak menunjukkan perubahan warna, maka reaksi menunjukkan positif dalam uji reduksi nitrat (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### 7) Uji Urease

Uji urease menggunakan *Medium Urea Base*. Masing-masing isolat bakteri diinokulasi ke dalam *Medium Urea Base* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari kuning menjadi pink yang sangat pekat (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### 8) Uji IMViC

Uji IMViC digunakan untuk membedakan bakteri enterik (Family Enterobacteriaceae, seperti *E. coli* dan *Enterobacter*). Terdiri dari Uji Indol, Uji Methyl Red dan Voges-Proskauer (MR-VP), serta uji sitrat. Uji IMViC tersebut dipaparkan sebagai berikut:

**a) Uji Indol**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri dapat membentuk indole dari degradasi asam amino tryptophan karena tidak semua bakteri mampu mendegradasi tryptophan menjadi bentuk indol. Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium *tryptone broth*, uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam *tryptone broth* lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah inkubasi, kemudian ditambahkan beberapa tetes *reagen Kovac's* pada kultur broth tersebut. Pada pengujian ini kultur broth yang telah di tetesi *reagen Kovac's* tidak perlu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada permukaan *broth* sedangkan hasil negatif menunjukkan warna kuning atau coklat pada permukaan broth. Warna merah muda ini terbentuk karena indole yang dihasilkan oleh bakteri bereaksi dengan para dimetilaminobenzaldehyd (p-dimetilaminobenzaldehyd) yang terkandung dalam reagen Kovac's (Cappuccino & Sherman, 2005).

**b) Uji Methyl Red (MR)**

Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium MR-VP broth. Uji Methyl Red (MR) digunakan untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi produk asam seperti asam laktat, asam asetat, atau asam format. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam MRVP broth lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 3-5 tetes *methyl red* pada

masing-masing tabung reaksi lalu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada *broth*. Hasil negatif menunjukkan warna kuning (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### c) Uji Voges-Proskauer (VP)

Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium MR-VP *broth*. Uji Voges-Proskauer (VP) digunakan untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi asetil metil karbinol. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam MRVP *broth* lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 5 tetes reagen VP A (yang mengandung naphtol) dan ditambahkan pula 5 tetes reagen VP B (yang mengandung KOH), kemudian dikocok hingga homogen. Sebelum memastikan hasilnya, dibiarkan dahulu selama 15-20 menit agar bereaksi. Reaksi positif akan terlihat dengan adanya perubahan warna menjadi pink atau merah yang mengindikasikan adanya kehadiran aseton. Sedangkan reaksi negatif pada *broth* adalah tidak berubahnya warna medium atau menjadi warna tembaga (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### d) Uji Simmon's sitrat

Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium Simmon's sitrat agar. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut dapat mengonversi sitrat (salah satu senyawa antara dalam siklus Kreb's) menjadi oksaloasetat. Satu ose isolat murni digesekkan pada agar miring sitrat lalu

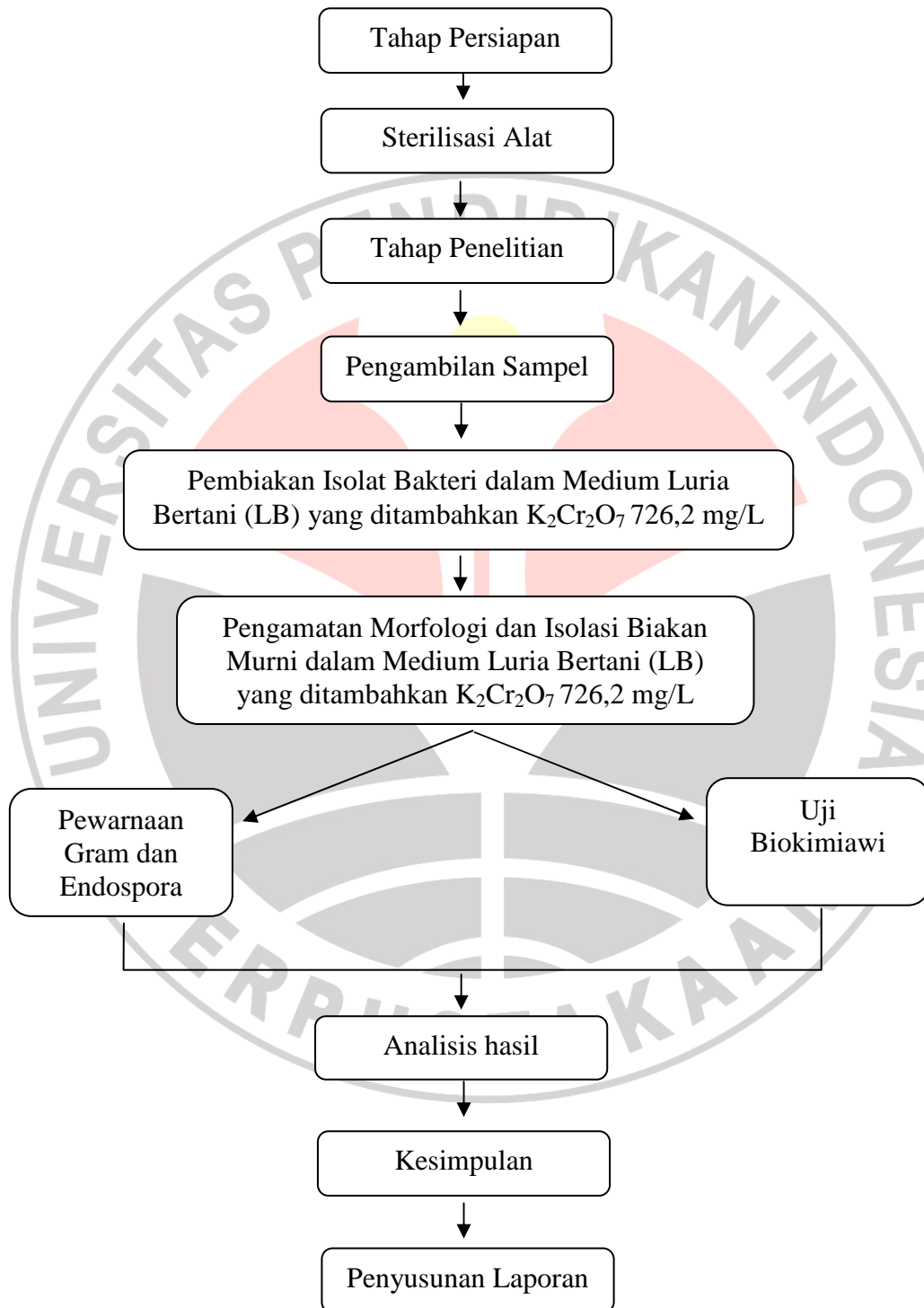
diinkubasi selama 24-48 jam. Interpretasi setelah inkubasi: reaksi positif adalah berubahnya warna hijau medium menjadi warna biru. Sedangkan reaksi negatif terjadi apabila tidak terjadi perubahan warna pada medium (tetap hijau) (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **F. Analisis Data**

Setelah sampling air limbah selesai dilakukan dan dihasilkan isolat murni pada medium agar miring, maka kultur bakteri dari air limbah penyamakan kulit akan diidentifikasi melalui reaksi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan uji biokimia agar diketahui karakteristik bakteri resisten logam krom. Kemudian hasil identifikasi bakteri dicocokkan dengan *Bergey's manual Determinative Bacteriology Ninth Edition (1994)* dan *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria Third Edition (1993)*.

### G. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1** Alur Penelitian