

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan menggunakan metode observasi yaitu untuk mengetahui jenis bakteri dan potensi sebagai remediator tanah yang tercemar oli bekas kendaraan bermotor.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah mikroorganisme bakteri yang ada pada tanah tercemar oli bekas kendaraan bermotor. Sampel yang digunakan adalah bakteri yang berperan sebagai agen bioremediasi oli bekas kendaraan bermotor dan oli bekas kendaraan bermotor.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset jurusan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Penelitian mulai dilaksanakan pada bulan Maret 2019.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Berdasarkan metodologi penelitian diatas, maka dalam melakukan penelitian ini dibutuhkan alat dan bahan sebagai berikut :

1. Alat

Tabel 3. 1
Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1	Autoklaf	All American	1 unit
2	Bak dan rak pencuci	-	1 set
3	<i>Beaker glass</i> 100 ml	Schoot Duran	6 unit
4	<i>Beaker glass</i> 250 ml	Schoot Duran	2 unit
5	<i>Beaker glass</i> 500 ml	Schoot Duran	2 unit
6	<i>Beaker glass</i> 1000 ml	Schoot Duran	1 unit
7	Botol semprot	-	1 unit
8	Bunsen	-	1 buah

9	Cawan Petri	-	20 buah
10	Ember	-	1 unit
11	Gelas ukur 10 ml	Iwaki CTE33 Asahi glass	1 unit
12	Gelas ukur 100 ml	Iwaki CTE33 Asahi glass	1 unit
13	Gelas ukur 500 ml	Iwaki CTE33 Asahi glass	1 unit
14	<i>Incubator</i>	-	1 unit
15	Jarum ode	-	5 buah
16	Jeriken 15 lt	-	1 unit
17	Kamera HP	Samsung	1 unit
18	Kertas saring	Whatman no 93	Secukupnya
19	Kertas lensa	-	Secukupnya
20	Labu Erlenmeyer	Iwaki TE-32 Pyrex	20 unit
21	Laminar Air Flow Horizontal	-	
22	Lemari pendingin	-	1 unit
23	Masker	AB-MED masker 3 Ply Ear LoopJ ilbab	1 set
24	Mikroskop	-	1 unit
25	Mikropipet (10-1000 µl)	Fisherbrand Elite	3 unit
26	Objek glass	Sail Brand	1 pak
27	Pipet tetes	-	5 unit
28	Sarung tangan	Sensi Gloves	1 set
29	Sentrifuge	Hettich zentrifugen EBA 12	1 unit
30	Shaker	EYELA Tokyo Rikakikai Co.,LTD.	1 unit
31	Spatula	-	
32	Spektrofotometer	Thermo Fisher Scientific Genesys 10-s	
33	Tabung reaksi	Pyrex	30 buah
34	Timbangan digital	Boeco Germany	1 unit

35	Waterbath shaker	Eyela Uni Thermo Shaker nts-1300	1 unit
----	------------------	-------------------------------------	--------

2. Bahan

Tabel 3. 2
Bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Akuades steril	500 ml
2	Alkohol 96%	1 liter
3	Alkohol 70%	500 ml
4	Bacto Agar	100 gram
5	CaCO ₃	5 gram
6	Ekstrak ragi	5 gram
7	H ₂ O ₂ 3%	5 ml
8	Indicator metil red	50 ml
9	KH ₂ PO ₄	5 gram
10	Kristal violet	50 ml
11	Malakit Hijau	50 ml
12	MgSO ₄ . 7H ₂ O	5 gram
13	Minyak imersi	Secukupnya
14	Minyak pelumas bekas	5 liter
15	MnCl ₂ . 7H ₂ O	5 gram
16	Na ₂ HPO ₄	5 gram
17	NH ₄ NO ₃	5 gram
18	n-heksana	100 ml
19	Reagen Kovac	50 ml
20	Reagen voges-Proskauer	50 ml
21	Safranin Gram	50 ml
22	Safranin Endospora	50 ml
23	Sampel Bakteri (Tanah tercemar)	1 ember
24	Reagen Sulfanilic acid 0,8%	10 ml

No	Nama Bahan	Jumlah
25	α -naphthylamine 0,6%	10 ml
26	Zink	20 gram
27	Media TSIA	10 ml
28	Lugol	10 ml
29	Ketoconazole 2%	10 gram
30	Medium Simon Sitrat agar	100 ml

3.5 Prosedur Penelitian

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

3.5.1 Tahap persiapan

Pada tahap persiapan ini dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian. Sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dengan cara membungkus semua alat yang akan digunakan dengan kertas yang rapat dan dimasukkan ke dalam plastik. Bahan yang akan digunakan juga dimasukkan dalam wadah kaca lalu selanjutnya dibungkus kertas dengan rapat dan dimasukkan plastik. Sterilisasi dilakukan dengan cara memasukkan semua alat dan bahan yang sudah disiapkan ke dalam autoklaf selama 15 – 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

3.5.2 Tahap penelitian

3.5.2.1 Pengambilan sampel

Sampel tanah yang tercemari oli bekas kendaraan bermotor diambil di bengkel sekitar Kuningan dan dibawa ke Laboratorium Riset Biologi FPMIPA UPI.

3.5.2.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk identifikasi dan uji potensi degradasi isolat bakteri menggunakan media SMSS, yang terdiri dari CaCO_3 , NH_4NO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, lalu ditambah ekstrak ragi 0,01% (b/v) dan selanjutnya media disebut SMSSe untuk memudahkan penyebutan (Aditiawati, Pikoli & Indriani, 2001). Penambahan ekstrak ragi berperan sebagai sumber nitrogen dalam bentuk asam amino dan *growth factor* untuk tambahan media.

Rifdah Hanifah, 2019

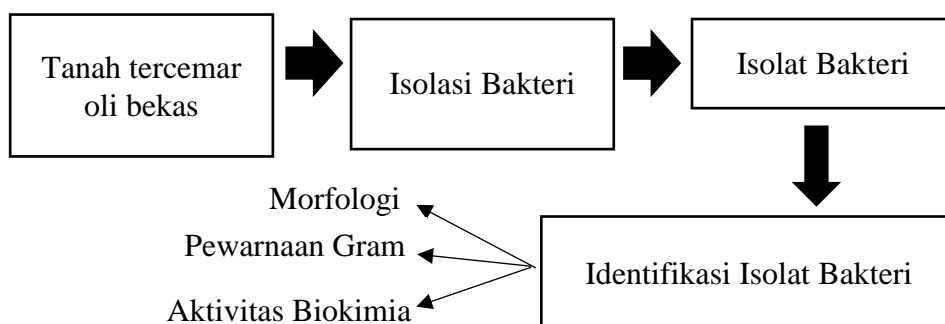
Isolasi dan Identifikasi Bakteri Yang Berpotensi Sebagai Remediator Tanah Tercemar Oli Bekas Kendaraan Bermotor

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Untuk media SMSSe cair terdiri dari 0,5 gram CaCO_3 ; 0,25 gram NH_4NO_3 ; 0,1 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 gram KH_2PO_4 ; 0,05 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 gram $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan ditambahkan ekstrak ragi sebanyak 0,01% (b/v) atau setara dengan 0,02 gram yang dilarutkan dalam 200 ml aquades steril, sedangkan untuk media padat ditambahkan *bacto agar* 2% supaya medium menjadi padat. Oli bekas ditambahkan pada media sebagai media selektif dan sumber karbon, dengan pH mencapai 6,8 – 7 (Nababan, 2008). Ditambahkan juga senyawa anti jamur Ketoconazole pada media untuk memastikan hanya bakteri yang dapat hidup pada media biakkan. Masing – masing media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C , dan tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit.

3.5.2.3 Isolasi Isolat Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Isolat bakteri yang akan diisolasi berasal dari tanah yang tercemar oli bekas kendaraan bermotor. Isolasi dimulai dengan dilakukannya pengocokan 10 gram tanah tercemar oli bekas kendaraan bermotor di dalam 100 ml medium SMSSe cair dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Metode yang digunakan untuk isolasi menggunakan metode pengenceran. Biakan cair diambil 1 ml untuk dibiakan pada media padat SMSS. Setiap koloni yang berbeda dipisahkan dan dibuat biakan murninya pada media yang sama. Isolat bakteri yang didapatkan kemudian akan diidentifikasi dengan cara pengamatan morfologi koloni, sel, pewarnaan gram dan uji-uji biokimia.



Gambar 3. 1 Bagan Isolasi Bakteri dari Tanah Tercemar Oli Bekas Kendaraan Bermotor

3.5.2.4 Pembuatan Biakan Murni

Biakan murni dibuat dengan memisahkan tiap koloni dari biakan campuran dengan menggunakan jarum inokulasi pada agar miring media KNA.

3.5.2.5 Seleksi Bakteri Pendegradasi Oli Bekas Kendaraan Bermotor

Seleksi dilakukan melalui metode sebagai berikut:

1. *Drop Collapse Test*

Uji ini dilakukan dengan meneteskan 2 μL minyak mentah ke dalam sumur mikroplate, kemudian dibiarkan selama 24 jam pada suhu ruang. Supernatan dari kultur bakteri uji (24 jam dalam *Nutrient Broth*) kemudian ditambahkan sebanyak 5 μL ke permukaan tetesan minyak. Bentuk tetesan pada permukaan minyak diamati setelah 1 menit dengan menggunakan kaca pembesar. Hasil dinyatakan positif apabila tetesan berubah menjadi datar, sedangkan tetesan yang tetap berbentuk bulat dinyatakan negatif tidak terdapat biosurfaktan (Jain *et al.* 1991).

2. *Oil Spreading Assay*

Akuades steril dimasukkan ke dalam cawan petri (diameter 15 cm) sebanyak 20 mL diikuti dengan penambahan 15 μL minyak mentah sehingga membentuk lapisan tipis pada permukaan akuades. Supernatan dari kultur bakteri kemudian ditambahkan sebanyak 10 μL ke permukaan minyak. Apabila supernatan tersebut mengandung biosurfaktan maka minyak akan terpisah dan membentuk zona jernih. Larutan Tween 20 digunakan sebagai kontrol positif dan akuades digunakan sebagai kontrol negatif (Morikawa *et al.*, 1993).

3.5.2.6 Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Oli Bekas

1. Pengamatan Morfologi

Dilakukan pengamatan morfologi dan sel bakteri dengan melihat ukuran koloni, margin, bentuk dan elevasi koloni. (Susanti & Trinanda, 2017).

2. Pewarnaan Gram

Akuades ditetaskan pada kaca objek lalu ditambahkan 1 ose biakan sampel, selanjutnya difiksasi di atas api. Sediaan ditetesi pewarna kristal violet dan dibiarkan 1 menit, cuci dengan air mengalir, selanjutnya ditetesi lugol diamkan 1 menit dan dicuci lagi dengan air mengalir. Alkohol 96% ditetaskan dan dibiarkan selama 10 – 20 detik, cuci pada air mengalir dan safranin ditambahkan lalu biarkan 30 detik selanjutnya dicuci lagi dengan air mengalir. Tahapan selanjutnya yaitu sediaan dikeringkan dengan menggunakan kertas isap, minyak imersi ditetaskan

untuk selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Apabila hasil pewarnaan menunjukkan bakteri berwarna merah maka bakteri termasuk bakteri gram negatif, sedangkan bila bakteri berwarna ungu maka bakteri termasuk pada bakteri gram positif (Fitri dan Yasmin, 2011). Dilakukan juga KOH *String test* untuk menguji apakah bakteri termasuk pada kelompok gram positif atau gram negatif. Cairan KOH akan lengket apabila bakteri termasuk golongan gram negatif, sedangkan apabila tidak lengket maka termasuk golongan bakteri gram positif.

3. Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan untuk mengetahui karakteristik ada tidaknya endospora dan letak endospora pada sel bakteri. Sediaan bakteri dibuat kemudian dilapisi kertas isap pada permukaan gelas objek untuk selanjutnya ditetesi pewarna malakit hijau. Sediaan bakteri terus ditetesi pewarna selama lima menit yang dilakukan di atas penangas air dan dijaga agar pewarna tidak kering. Setelah lima menit kelebihan warna pada gelas objek dibuang kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya sediaan ditetesi safranin selama satu menit, kemudian dibilas akuades dan dibiarkan hingga mengering. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x , dengan penambahan minyak imersi pada objek. Endospora akan terlihat berwarna hijau sedangkan sel vegetatif berwarna merah (Cappuccino & Sherman, 2011).

4. Uji Biokimia

a. Uji Hidrolisis Pati

Pada uji hidrolisis pati bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan pada medium pati dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya sampel ditetesi larutan iodium. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Cappuccino & Sherman, 2011).

b. Uji Hidrolisis Lemak

Uji hidrolisis lemak juga dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri berumur 24 jam pada medium lemak lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reaksi positif bakteri akan menghasilkan zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2011).

c. Uji Hidrolisis Kasein

Uji kasein dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menguraikan protein menjadi asam amino dengan bantuan enzim protease, caranya dengan menginkubasi bakteri selama 1 -2 hari pada media agar kasein, kemudian diamati daerah jernih yang terbentuk disekitar pertumbuhan bakteri (Cappuccino & Sherman, 2011).

d. Uji Hidrolisis Gelatin

Uji hidrolisis gelatin, isolat bakteri yang berumur 24 jam ditusuk pada media gelatin lalu diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 37°C. Kultur selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari es selama 15 menit. Apabila hasil positif maka konsistensi media gelatin akan mencair. (Yogyaswari dkk, 2016).

e. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan H₂O₂ 3% pada 1 ose sampel bakteri (Cappuccino & Sherman, 2011).

f. Uji Motilitas

Uji motilitas untuk mengetahui kemampuan pergerakan bakteri dengan menginokulasikan ose secara *stab* pada medium SIM agar lalu diinkubasi selama 18-24 ajm. Hasil positif ditunjukkan apabila ada daerah keruh yang meluas dari garis tusuk inokulasi (Yogyaswari dkk, 2016).

g. Uji Produksi H₂S

Uji produksi H₂S dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan hidrogen sulfida (H₂S). Dilakukan *stab* inokulasi pada medium SIM Agar secara aseptik. Respons positif ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna medium menjadi hitam/kehitaman setelah 24-48 jam inkubasi pada suhu 37°C disekitar jalur inokulasi (Cappuccino & Sherman, 2011).

h. Uji IMViC

Uji Indole dengan mengamati perubahan warna yang terjadi setelah diberi penambahan reagen Kovac dalam media KNA yang telah diinokulasikan isolat bakteri selama 1 – 2 hari. Uji VP (Voges-

Proskauer) bertujuan untuk menguji adanya 2,3-butadienol yang dihasilkan bakteri, dengan cara meneteskan reagen barrit A dan barrit B pada medium yang telah diberi inokulasi bakteri. Uji MR dilakukan dengan cara meneteskan reagen MR pada medium MR/VP yang telah diinokulasi bakteri dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil positif akan menunjukkan warna merah pada permukaan medium, sedangkan apabila tidak terjadi perubahan warna menunjukkan hasil negatif (Cappuccino & Sherman, 2011).

Untuk menguji kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama dilakukan Uji *Simmon's citrate* dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium *Simmon's Citrate* agar dengan goresan selama 1-2 hari. Medium akan berubah warna menjadi biru apabila hasil positif, sedangkan untuk hasil negatif medium akan tetap berwarna hijau/tidak terjadi perubahan warna (Cappuccino & Sherman, 2011).

i. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji karbohidrat dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri berumur 24 jam pada NA ke dalam kaldu sukrosa, laktosa dan dekstrosa pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif akan merubah warna kaldu dari ungu menjadi kuning karena terbentuknya asam (Yogyaswari dkk, 2016).

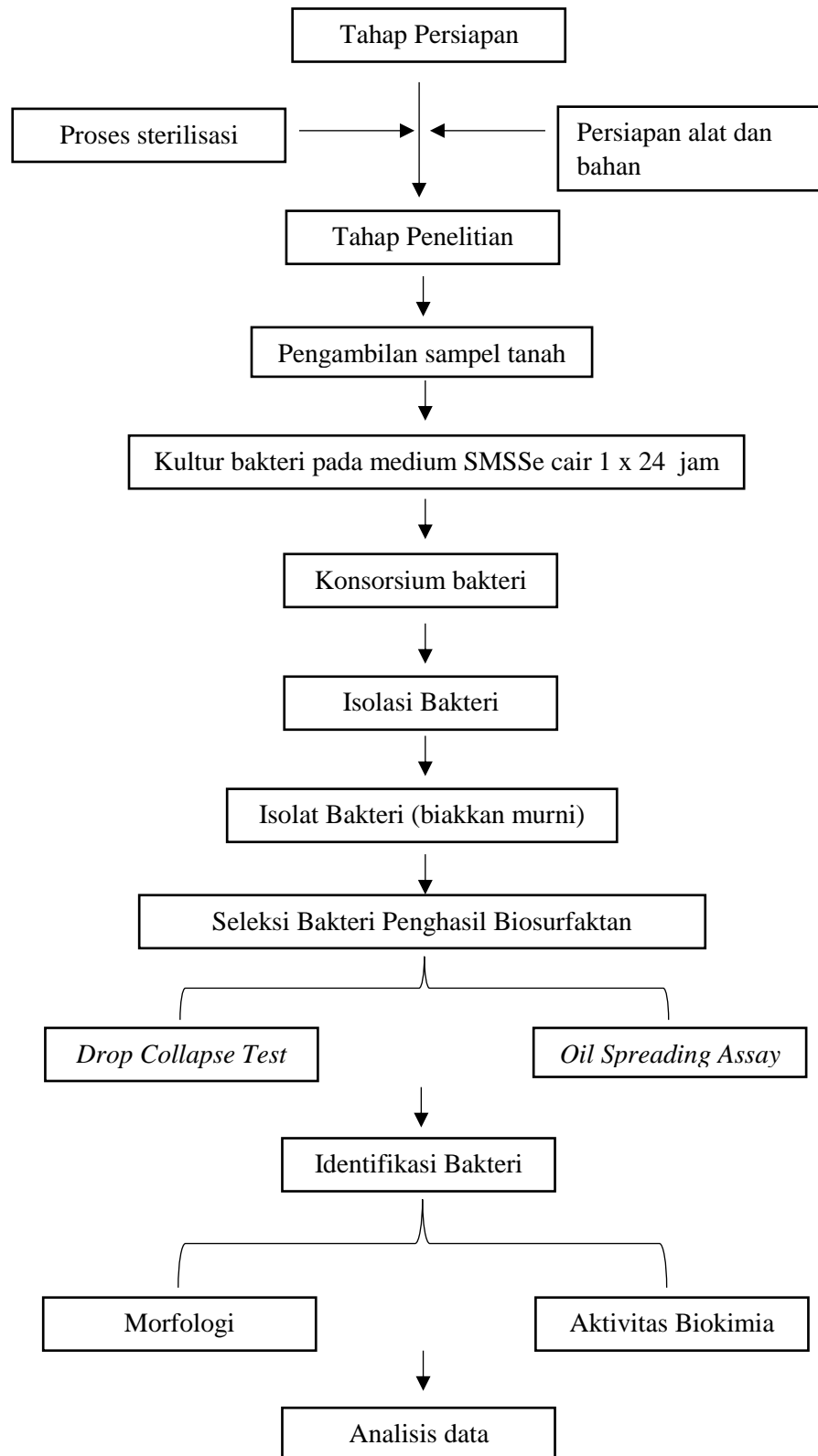
3.5.2.7 Analisis data

Dilakukan analisis data dari hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia untuk mengidentifikasi jenis bakteri.

3.6 Pengolahan Data

Data yang dihasilkan berupa data morfologi, pewarnaan gram, dan uji biokimia. Data morfologi, pewarnaan gram dan uji biokimia digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon.

3.7 Alur Penelitian



Gambar 3. 2 Bagan Alur Penelitian