

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 Penelitian

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yang mampu untuk mendegradasi senyawa fenol dari limbah cair industri kertas.
2. Sampel dalam penelitian ini adalah semua bakteri yang tumbuh pada *Mineral Salt Medium* (MSM) Agar yang ditambahkan 0,26 mg/l fenol pada cawan Petri (Chakraborty, 2010).

C. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dan pengambilan sampel akan dilakukan di Balai Besar Pulp dan Kertas, Dayeuh kolot, Bandung.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam 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: Daftar alat-alat penelitian

No.	Alat-alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Indikator pH universal	Merck	10 strip
2.	Termometer	-	2 buah
3.	Autoclave	EYELA model HL36AE	1 unit
4.	Cawan Petri	Pyrex	50 buah
5.	Tabung reaksi	Pyrex	100 buah
6.	Bunsen		1 buah
7.	Lup inokulasi		2 buah
8.	Jarum inokulasi		2 buah
9.	Gelas beaker (1 L)	Pyrex	4 buah
10.	Hotplate	Eyela magnetic stirrer RCH 3	1 unit
11.	Inkubator shaker	Boekel model 136400	1 unit
12.	Objek gelas	Sail brand (25,4 x 76,2 mm)	1 pak
13.	Cover gelas	Focus (18 x18 mm)	1 pak
14.	Bak pewarna		1 buah
15.	Rak kawat		1 buah
16.	Mikroskop	Novel XSZ-107BN	1 unit
17.	Rak tabung		1 buah
18.	<i>Freezer</i>	PT25.221.03.021.BM	1 unit
19.	Timbangan digital	AND HF-300	1 unit
20.	Pipet tetes		5 buah
21.	Oven	Memmert	1 unit
22.	Staining jar		1 buah
23.	Vortex	Sibata TTM 1	1 buah

No.	Alat-alat	Spesifikasi	Jumlah
24.	Plastik wrap		2 buah
25.	Gelas ukur (100 ml)	Pyrex	1 buah
26.	Sarung tangan karet steril	Latex master	1 pak
27.	Kertas label	No 111	1 pak
28.	Erlenmeyer (250 ml)	Pyrex	12 buah
29.	Colony counter	Sibata CL-560	1 unit
30.	Whatman filter paper	No#1	1 pak
31.	Magnetic stirrer	Eyela RCH-3	1 buah
32.	Sentrifuge	Hettich EBA-12	1 buah
33.	Spektrofotometer		1 unit

Tabel 3.2: Bahan-bahan Penelitian

No.	Bahan-bahan	Jumlah
1.	Medium <i>Nutrient Broth</i>	500 ml
2.	Medium <i>Mineral Salt</i>	100 ml
3.	Safranin	10 ml
4.	Kristal violet	10 ml
5.	Malakit hijau	30 ml
6.	Alkohol 96%	500 ml
7.	Kaldu laktosa	300 ml
8.	Kaldu sukrosa	300 ml
9.	Kaldu dextrose	300 ml
10.	Larutan aminoantipirin	2 %
11.	Lugol	
12.	Pati agar	300 ml
13.	Lipid agar	300 ml
14.	Kasein agar	300 ml
15.	Gelatin agar	300 ml
16.	H ₂ O ₂	20 ml
17.	<i>Urea base</i>	25 ml
18.	<i>Trypticase-nitrate broth</i>	200 ml
19.	Larutan dimethyl 1-naphthylamine	20 ml
20.	Asam sulfanilat	20 ml
21.	SIM (<i>Sulfide Indol Motily</i>) agar	200 ml

No.	Bahan-bahan	Jumlah
22.	<i>Tryptone broth</i>	200 ml
23.	Indole reagen (Kovac's reagen)	10 ml
24.	MRVP broth	100 ml
25.	Methyl red	10 ml
26.	Reagen Barritt's A	10 ml
27.	Reagen Barritt's B	10 ml
28.	Simmon's sitrat agar	200 ml
29.	Fenol	60 mg/l
30.	Akuades	10 liter

E. Langkah Kerja

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

1. Tahap persiapan

a. Pembuatan Medium

Medium yang dibuat dalam tahap awal isolasi bakteri pada penelitian ini yaitu *Mineral Salt Medium* (MSM) dan medium Kaldu Nutrisi Agar (KNA).

b. Sterilisasi Alat dan Medium

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 kedalam autoclave selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 Lbs. kegiatan ini dilakukan di dalam Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan sampel

Limbah cair kertas diambil dari Balai Besar Pulp dan Kertas Dayeuhkolot Kabupaten Bandung 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 Senyawa Fenol

Pengukuran faktor lingkungan yang dilakukan mencakup pH limbah cair kertas, temperatur limbah, dan oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen*) pada lokasi pengambilan sampel di Balai Besar Pulp dan Kertas. Pengukuran konsentrasi senyawa fenol pada limbah cair industri kertas dianalisis menggunakan alat spektrofotometri di Balai Laboratorium Kesehatan.

c. Pembiakan Isolat Bakteri

Sampel diencerkan terlebih dahulu menggunakan metode pengenceran, dilakukan pengenceran dari mulai 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Setelah seri pengenceran selesai kemudian diambil 1 ml sampel yang diambil dari seri pengenceran ke 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} lalu di inokulasikan ke dalam cawan Petri yang telah berisi medium MSM yang telah ditambahkan 1 ml larutan fenol dengan konsentrasi 0,26 mg/L sesuai hasil pengukuran dalam Spektrofotometer, setelah itu diinkubasi pada suhu 37° selama 48 jam. Tahap selanjutnya yaitu dilakukan pemurnian isolat, pemurnian isolat pada awalnya dilakukan dengan menggunakan medium MSM yang tidak ditambahkan larutan fenol dengan konsentrasi 0,26 mg/L namun setelah diinkubasi hingga 4 hari waktu inkubasi tidak terlihat adanya koloni bakteri yang tumbuh akhirnya pemurnian isolat dilakukan dengan menggunakan medium KNA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

d. Pengamatan Morfologi dan Isolasi Biakan Murni Bakteri

Pengamatan morfologi dilakukan setelah 48 jam waktu inkubasi. Pengamatan morfologi koloni bakteri merujuk kepada Cappuccino (2005), ciri morfologi koloni bakteri yang diamati mulai dari bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian. Setiap koloni dipindahkan 1 *ose* ke dalam cawan Petri yang berisi medium MSM yang telah ditambahkan 1 ml larutan fenol dengan konsentrasi 0,26 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 3 menit, kelebihan zat warna dibuang dan ditetesi lugol hingga menggenangi sediaan lalu biarkan selama 45-60 detik. Selanjutnya sediaan dimasukkan kedalam staining jar berisi alkohol 96%, digoyang selama 1 menit lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas isap. Safranin dituangkan di atas sediaan yang telah kering dan dibiarkan selama 3 menit. Setelah itu dicuci dengan aquades menggunakan botol semprot dan dikeringkan di udara. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Hasil pewarnaan akan berwarna ungu jika bakteri berjenis Gram positif dan akan

berwarna merah jika bakteri 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 24 jam dibuat sediaan mikroskopik, kemudian difiksasi panas, lalu ditetesi dengan larutan malakit hijau diatas sediaan mikroskopik yang telah dialasi dengan kertas isap pada permukaan sediaan. Kegiatan tersebut dilakukan secara terus menerus selama 5 menit diatas penangas 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 pebesaran 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 3 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 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C. Warna

kuning dan adanya gelembung/gas pada tabung Durham menunjukkan hasil yang positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

2) Uji Hidrolisi Pati, Lipid, Gelatin, dan Kasein

a) Hidrolisis Pati

Hidrolisis pati menggunakan Medium Agar Pati. Pati dapat dihidrolisis oleh mikroorganisme tertentu dengan hasil akhir yaitu 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 diinokulasikan kedalam Medium Agar Pati dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan iodium/lugol diteteskan disekitar koloni bakteri pada medium tumbuh dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika terbentuk daerah bening disekitar 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 isolate 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 H₂O₂ 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 H₂S

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium *Sulfide Indole Motility* (SIM) Agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 x 24 jam. Hasil positif (terbentuknya H₂S) 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°C selama 24 jam. Kemudian medium ditetesi 3-4 tetes larutan nitrat A dan larutan nitrat B di atas permukaan kultur, didiamkan beberapa menit kemudian lihat perubahan yang terjadi. Perubahan warna medium putih kekuningan menjadi warna 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 warna merah *cherry*, maka reaksi menunjukkan negatif dan bila reaksi 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 1-2 x 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 (Famili *Enterobacteriaceae*, seperti *E. coli* dan *Enterobacter*). Terdiri dari Uji Indol, 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 Indol 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 24 jam. Setelah inkubasi, kemudian ditambahkan beberapa tetes

reagen Kovac's pada kultur broth tersebut. Pada pengujian ini kultur broth yang telah ditetesi *reagen Kovac's* tidak perlu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada permukaan *broth*. Warna merah muda ini terbentuk karena indol yang dihasilkan oleh bakteri bereaksi dengan para-dimetilaminobenzaldehid (p-dimetilaminobenzaldehid) 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 menginokulasikan masing-masing isolat bakteri ke dalam MR-VP broth lalu diinkubasi selama 24 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 medium MR-VP *broth* lalu diinkubasi selama 24 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 ditunjukkan 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 Krebs) 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).

h. Uji Kemampuan Isolat Mendegradasi Fenol

Uji kemampuan bakteri dalam mendegradasi fenol dilakukan dengan cara menginokulasikan masing-masing isolat bakteri yang telah dikultur murni ke dalam medium MSM yang telah ditambahkan larutan fenol sebanyak 60 mg/L kemudian, masing-masing isolat diinkubasikan dalam inkubator shaker dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selain itu dibuat juga medium MSM yang ditambahkan 60 mg/L larutan fenol tanpa campuran dari kedua isolat, medium tersebut digunakan sebagai kontrol.

Untuk mengetahui hasil dari uji kemampuan isolat dalam mendegradasi fenol dengan metode analisis HPLC (Mohite *et al.*, 2010) yaitu dengan cara menghitung perbandingan area standar dengan area sampel secara matematis dari hasil kromatogram HPLC, berikut merupakan rumus penghitungan:

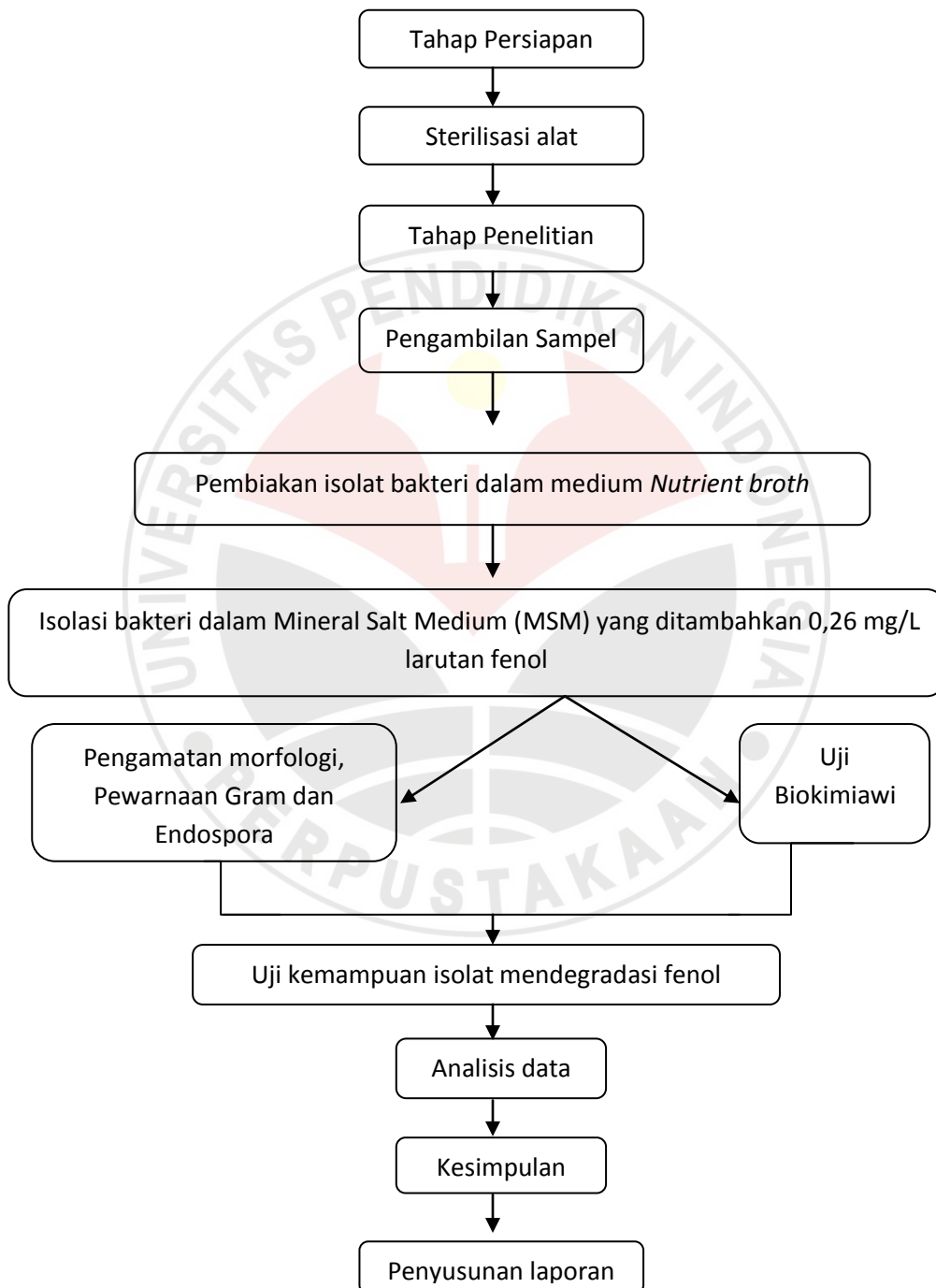
$$\frac{\text{Area Sampel}}{\text{Konsentrasi Sampel}} = \frac{\text{Area Standar}}{\text{Konsentrasi Standar}}$$

F. Analisis Data

Setelah sampling limbah cair dari industri kertas selesai dilakukan dan dihasilkan isolat murni pada medium agar miring, maka kultur bakteri dari limbah cair tersebut akan diidentifikasi melalui reaksi pewarnaan Gram, pewarnaan Endospora dan uji biokimia agar diketahui karakteristik bakteri aerob yang mampu mendegradasi senyawa fenol dari limbah cair kertas sebagai tahap identifikasi yang diharapkan. Kemudian hasil identifikasi bakteri dicocokkan dengan buku *Bergey's Manual of Systematic 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 berikut:



Gambar 3.1 Alur penelitian