

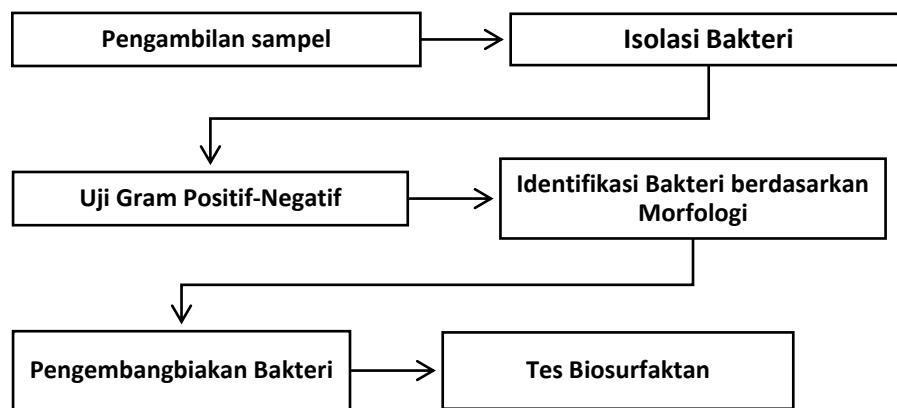
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tahapan Penelitian

Penelitian akan difokuskan pada isolasi dan identifikasi morfologi bakteri potensial mendegradasi hidrokarbon pada tanah tercemar tumpahan minyak mentah.

Sampel diambil dari tumpahan minyak di lapangan minyak Suban. Seluruh tahap percobaan dilakukan dalam skala laboratorium. Tahapan penelitian disajikan dalam diagram alir pada gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1. Diagram Alir Tahapan Penelitian Secara Keseluruhan

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Isolasi dan Pemeliharaan Bakteri

Bahan:

1. Nutrient Agar

2. Aquades
3. BHMS agar
4. Suspeni bakteri
5. Nutrien Broth
6. BHMS cair

Alat :

1. Tabung reaksi
2. Pipet ukur 1 ml dan karet hisap
3. Pipet ukur 0,1 ml dan karet hisap
4. Erlenmeyer
5. Gelas Beaker
6. Cawan petri steril
7. Pembakar Bunsen
8. Rak Tabung
9. Oven
10. Autoklaf
11. Inkubator

3.2.2 Uji Gram Positif- Negatif dan Identifikasi Morfologi Bakteri

Bahan:

1. Biakan bakteri
2. Larutan Kristal Violet
3. Larutan Lugol
4. Alkohol
5. Larutan Fuchsin Basa

Alat:

1. Kaca Objek
2. Jarum inokulasi
3. Gelas kimia 100 ml

4. Pembakar Bunsen
5. Kapas
6. Kertas Saring
7. Kaca preparat
8. Mikroskop

3.2.3 Pengembangbiakan Bakteri

Bahan:

1. Nutrient Agar
2. BHMS Agar

Alat

1. Tabung Reaksi
2. Inkubator

3.2.4 Tes Haemolysis

Bahan

1. Blood Agar

Alat

1. Jarum ose
2. Bunsen
3. Alkohol

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel *crude oil* diambil dari kilang minyak milik warga Lokal Desa Sungaiangit.

3.3.2 Isolasi Bakteri dari Sampel

Isolasi dilakukan dengan cara tuang atau teknik *pour plate*. Dari suspensi sampel diambil 1 ml dan di encerkan sampai pengenceran 10^{-3} . Dari tiap pengenceran diambil 1 ml dan diletakkan ke dalam cawan petri berisi media NA (gram per liter adalah 1 gram ekstrak sapi, 2 gram ekstrak yeast, 5 gram peptone, 5 gram NaCl, 1 liter akuades, serta tambahan 15 gram agar khusus untuk media agar nutrisi.) dan media BHMS ((per liter air suling) 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 g $CaCl_2$, 1 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 1 g NH_4NO_3 , 2 tetes $FeCl_3$ 60%, Nutrien agar 28 g). Dengan perlahan-lahan pinggang petri itu digoyang dengan gerakan memutar tanpa diangkat dari permukaan meja, sehingga bahan pemeriksaan tercampur rata dalam medium pembiakan kemudian didiamkan sampai beku. Inkubasi selama 24 – 48 jam. Selanjutnya dilakukan pemurnian kultur untuk mendapatkan isolat murni (*pure cultur*).

3.3.3 Pemindahan dengan Kawat Inokulasi

Ujung kawat inokulasi sebaiknya dari platina atau dari nikrom; ujung kawat boleh lurusm boleh juga berupa kolongan yang berdiameter 1-3 mm. Lebih dahulu ujung kawat dipijarkan, sedang sisanya sampai tangkai cukup dilewatkan di nyala api saja. Setelah dingin kembali, ujung kawat itu disentuhkan suatu koloni. Mulut tabung tempat pembiaraan itu dipanasi juga setelah sumbatannya diambil. Setelah pengambilan inokulum (sampel bakteri) selesai, mulut tabung dipanasi lagi kemudian disumbat seperti semula. Ujung kawat yang membawakan inokulum tersebut digesekkan pada medium baru atau pada suatu kaca benda, kalau tujuannya memang akan membuat sediaan. (Waluyo, 2004)

3.3.4 Pembiakan Bakteri pada Media Miring

Tabung medium pembiakan miring dipegang dengan tangan kiri di bagian ujung bawah. Bahan penanaman diambil dengan jarum dari koloni

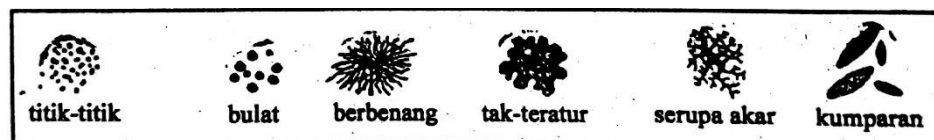
pada lempeng pembiakan. Dengan jari kelingking tangan kanan tutup tabung dijepit dan diambil diputar ditarik keluar. Setelah itu segera mulut tabung dijilatkan pada api. Dengan mulut tabung masih tetap menghadap api (jarak kira-kira 10 – 15 cm) biakan yang melekat pada ujung jarum ditanam pada permukaan medium pembiakan miring tersebut dimulai dari dasar tabung dibuat garis berkelok-kelok sampai ke atas. Cara ini dilakukan bila penanaman ini hanya dimaksudkan untuk memperbanyak biakan atau untuk persediaan. Segera setelah menanam mulut tabung dijilatkan pada api, kemudian segera ditutup dan jarum bekas penanaman dipijarkan sebelum diletakkan kembali ke tempatnya. Inkubasi selama 24 jam

3.3.5 Pemeriksaan Pertumbuhan Bakteri

Pada semua medium pembiakan padat umumnya baik yang berbentuk lempeng maupun miring perlu diperhatikan.

1. Bentuk Koloni

Koloni-koloni biasanya menonjol dari permukaan medium pembiakan, dan sifat penonjolan ini dapat berbentuk datar, datar meninggi, konveks, muncung kubah, gong, berlekuk tengah (berpusat).



Gambar 3.2 Bentuk-bentuk koloni (Irianto,2006)

2. Ukuran Koloni

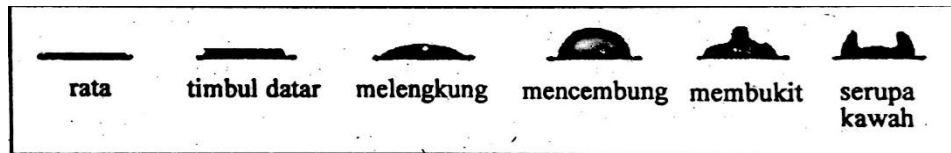
Menurut diameter rata-rata, ukuran koloni berbeda-beda pada berbagai jenis

3. Rupa Koloni

Rupa koloni dapat seperti sebuah titik, bulat, tidak rata, miseloid, berfilamen, atau rizoid.

4. Permukaan Koloni

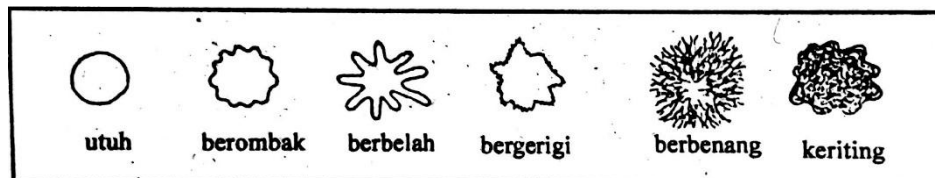
Permukaan koloni dapat *licin* (smooth), kasar (rough), berlingkaran (konsentris), berjari (radial).



Gambar 3.3 Bentuk-bentuk permukaan koloni, (Irianto,2006)

5. Tepi Koloni

Tepi koloni dapat rata, berombak, berkeping, bergerigi, berfilamen.



Gambar 3.4 Bentuk tepi koloni. (Irianto,2006)

6. Struktur Bagian Tengah

Lebih ke dalam dari tepi struktur koloni dapat berbentuk amorf, bergranula halus atau kasar, berfilamen, keriting, atau konsentris.

7. Warna Koloni

Koloni dapat berwarna kuning, merah hijau, tengguli, berfluoresensi dan lain-lain.

8. Bau Koloni

Ada koloni yang berbau khas atau berbau menyerupai bau benda lain, atau tidak berbau sama sekali.

9. Kepadatan Koloni

Koloni dapat berupa lendir, liat, seperti mentega, getas.

Pada medium pembiakan penyubur (enriched medium), khususnya yang ditambah darah, harus diperhatikan perubahan yang terjadi pada medium itu sebagai berikut:

- a. Alfa-hemolisis, di sekitar koloni terdapat daerah kehijauan

- b. Beta-hemolisis, di sekitar koloni terdapat daerah bening.
- c. Anhemolisis, di sekitar koloni tidak terdapat perubahan. (Koes Irianto, 2006)

3.4 Media

1. Medium kultur yang digunakan terdiri dari agar nutrisi (NA). Komposisi medium tersebut dalam gram per liter adalah 1 gram ekstrak sapi, 2 gram ekstrak yeast, 5 gram peptone, 5 gram NaCl, 1 liter akuades, serta tambahan 15 gram agar khusus untuk media agar nutrisi.

2. Media Bushnell Hass Garam Mineral (BHMS) yang terdiri dari minyak mentah di 0,1 ml konsentrasi. Bakteri yang dipelihara pada medium garam mineral baik cair dan padat dengan minyak mentah sebagai sumber. BHMS karbon tunggal yang terkandung (per liter air suling) 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 g $CaCl_2$, 1 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 1 g NH_4NO_3 , 2 tetes $FeCl_3$ 60%, Bacto Agar 28 g.

3. Blood Agar

3.5 Pengecatan Gram

Atas dasar pengecatan Gram, dunia bakteri dibagi menjadi dua golongan besar, yaitu *bakteri Gram positif* dan *Gram negatif*.

Tabel 3.1 Ikhtisar Pengecatan Gram (Irianto, 2006)

Perlakuan	Waktu	Hasil pada Bakteri	
		Gram +	Gram -
Kristal Violet	30 detik	ungu	ungu
Cuci dengan air dan keringkan			
Larutan Iodium	30 detik	-	-
Cuci dengan air dan keringkan			

Perlakuan	Waktu	Hasil pada Bakteri	
		Gram +	Gram -
Deklorisasi dengan alkohol	20 detik	Ungu	Warna Luntur
Cuci dengan air dan keringkan			
Zat warna kontras	30 detik	Ungu	Warna Luntur
Cuci dengan air dan keringkan			

3.6 Seleksi Isolat Penghasil Biosurfaktan

Isolat murni yang berhasil didapatkan pada tahap sebelumnya selanjutnya diseleksi dengan menggunakan metode gesek dan menggunakan media *Blood Agar* untuk mendapatkan isolat yang mampu menghasilkan biosurfaktan.