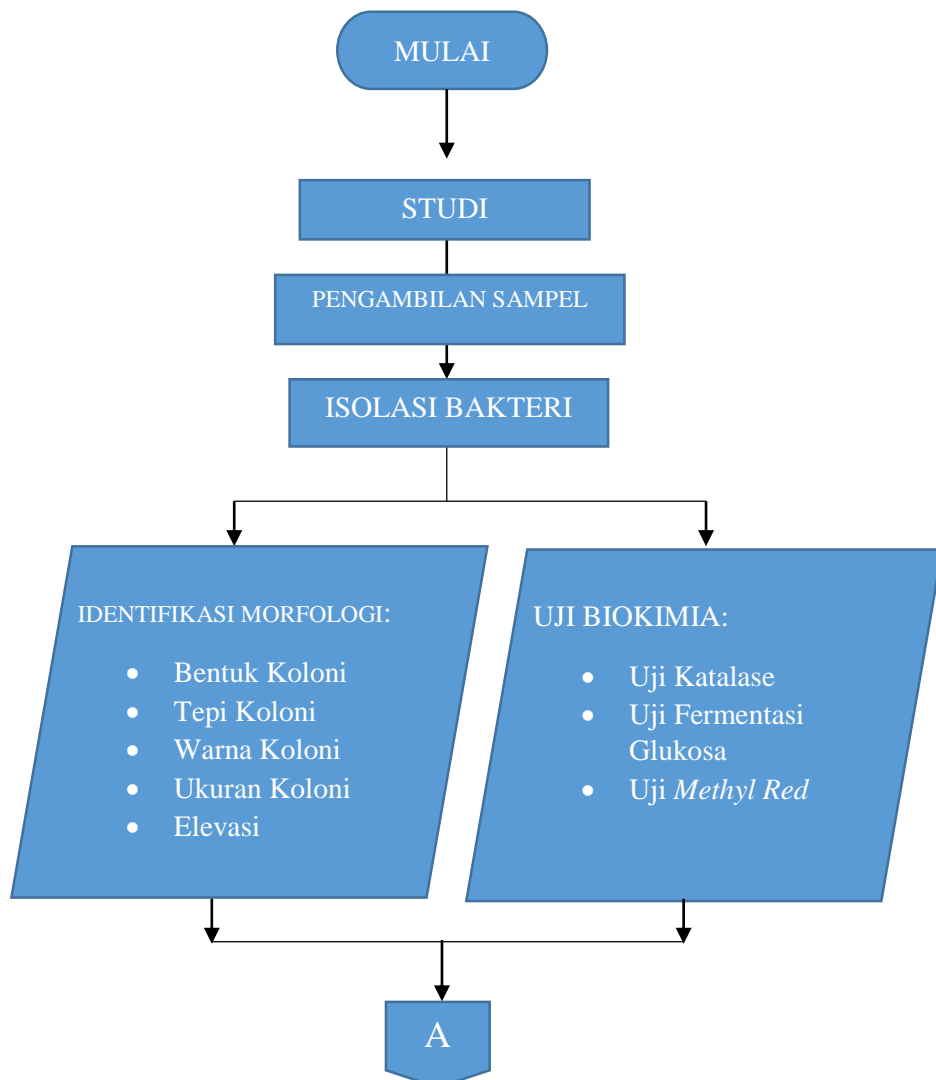


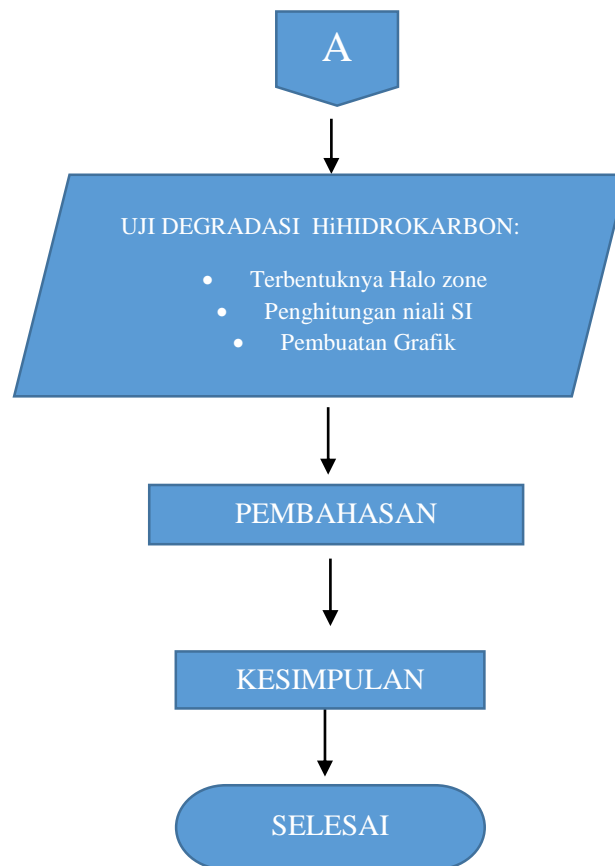
BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Kegiatan Penelitian

Kerangka kegiatan pada penelitian ini ditunjukkan pada gambar 3.1 berikut:



Gambar 3.1. . Karangka Penelitian Isolasi Bakteri Pendegradasi Tanah Tercemar Senyawa Hidrokarbon PT. KAI (persero) UPT Balai Yasa Yogyakarta



Gambar 3.1. Karangka Penelitian Isolasi Bakteri Pendegradasi Tanah Tercemar Senyawa Hidrokarbon PT. KAI (persero) UPT Balai Yasa Yogyakarta (lanjutan)

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Sampel yang digunakan berasal dari tanah tercemar oli dan/atau solar yang berlokasi di PT. KAI (persero) UPT Balai Yasa Yogyakarta, Demangan, Gondokusumo, Yogyakarta. Tepatnya di lokasi penampungan limbah sisa pencucian lokomotif. Sedangkan, penelitian bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta. (Juli 2018—Desember 2018).

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain adalah cawan petri, pembakar spiritus, jarum tanam bulat (ose), jarum tanam tajam, corong gelas, botol alkohol, batang pengaduk, spatula, tabung Durham, Tabung reaksi, labu Erlenmeyer, Gelas ukur, Gelas Beaker, Corong pemisah, Mortar, Spatel Drygalski, Pinsar, Pipet volumetrik, Mikropipet, Autoklaf, Oven, *Shaker incubator*, *Anaerobic jar*, dan Kamera

3.2.2. Bahan

A. Sampel Tanah

Sampel tanah yang digunakan berasal dari PT. KAI (persero) UPT Balai Yasa Yogyakarta. Pengambilan sampel tanah menggunakan alat Bor Tanah Manual dengan sampel tanah yang digunakan adalah tanah yang berada pada kedalaman tanah 10 cm dari permukaan tanah.

B. Media

Media-media yang digunakan dalam penelitian adalah medium minimal bebas carbon (*Carbon Free Minimal Medium*, CFMM) sebagai media tumbuh bakteri, serta media *Phenol Red Broth*, *Glucose Phosphate Broth* yang digunakan dalam pengujian reaksi biokimi bakteri.

3.3. Cara Kerja

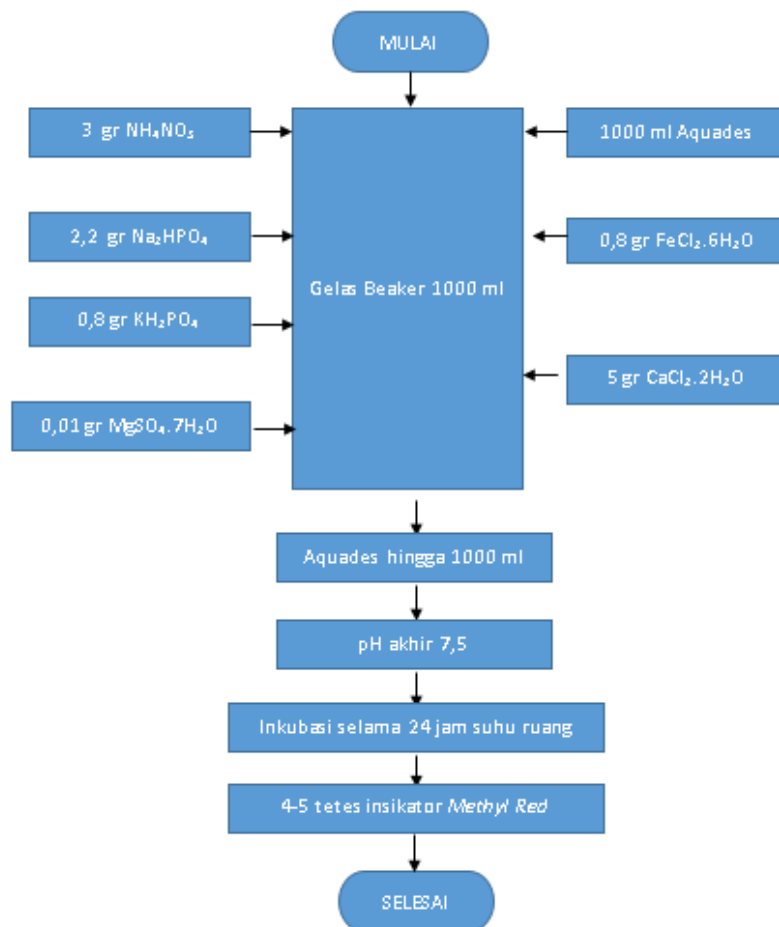
3.3.1. Penyimpanan Sampel Tanah

Sampel tanah yang diambil disimpan dalam kantong plastik transparan. Masing-masing kantong plastik diberi nomor sesuai dengan nomor titik sampling.

3.3.2. Pembuatan Media

A. Media CFMM

Media *Carbon Free Minimum Media* (CFMM) digunakan sebagai media tumbuh bakteri. Langkah pembuatan media CFMM adalah sebagai berikut,



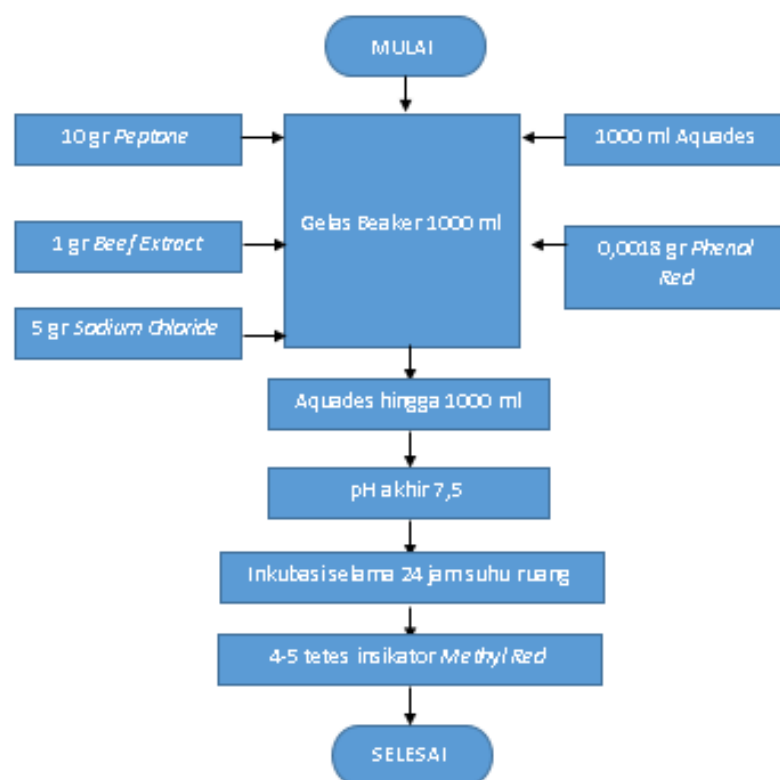
Gambar 3.2. Pembuatan Media *Carbon Free Minimum Media*

Larutkan secara berurutan 3,0 g NH_4NO_3 ; 2,2 g Na_2HPO_4 ; 0,8 g KH_2PO_4 ; 0,01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dengan akuades 1.000 ml. Sesuaikan pH larutan menjadi pH 7,5 dengan menambah NaOH 0,1 N, lalu tambahkan 15 g agar. Sterilisasi medium pada suhu 121°C , tekanan 0,1 MPa

selama 20 menit. Dinginkan medium lalu tambahkan substrat PAH (fenantrena, antrakena, fluorena, atau dibenzotiofena) dengan konsentrasi akhir 100 mg/L (Saraswati, 2007).

B. Media *Phenol Red Broth*

Media *Phenol Red Broth* digunakan sebagai media tumbuh bakteri yang akan diuji kemampuannya dalam memfermentasi glukosa



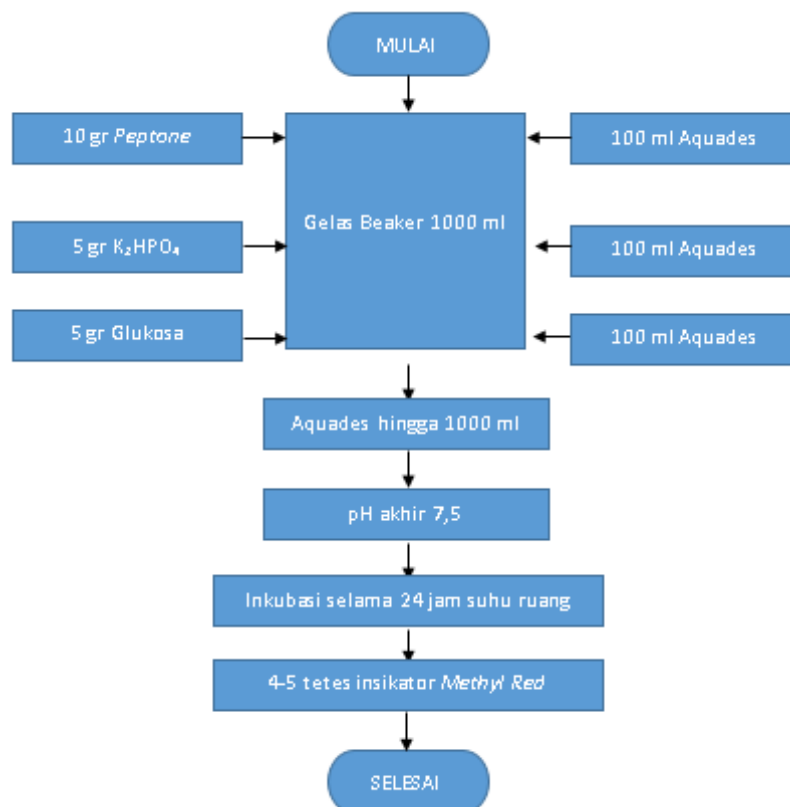
Gambar 3.3. Pembuatan *Media Phenol Red Broth*

Langkah pembuatan media adalah sebagai berikut, larutkan secara berurutan 10 g *Proteose Peptone*; 1 g *Beef Extract*; 5 g *Sodium Chloride*; 0,0018 g *Phenol Red* dengan aquades sebanyak 1000 ml dan pH akhir adalah 7,4. Bakteri yang akan diuji diinokulasikan kedalam media dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Setelah inkubasi selama 24 jam maka akan timbul reaksi, jika reaksi positif maka ditandai dengan perubahan warna

media dari merah menjadi warna kuning. Sedangkan jika reaksi negatif yang muncul akan ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media (Ewing, 1986).

C. Media *Glucose Phosphate Broth*

Media *Glucose Phosphate Broth* digunakan sebagai media tumbuh bakteri yang akan diuji kemampuannya dalam memfermentasi metilen glikol



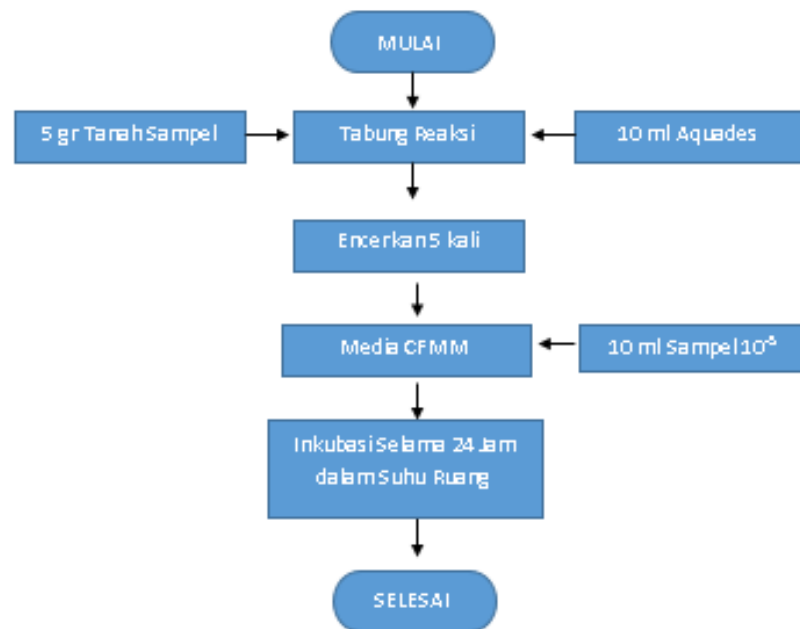
Gambar 3.4. Pembuatan Media *Glucose Phosphat Broth*

Langkah pembuatan media adalah sebagai berikut, larutkan secara berurutan 10 g Peptone; 5 g K₂HPO₄; 5 g Glukosa dengan aquades sebanyak 1000 ml. Bakteri yang akan diuji diinokulasikan kedalam media dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Setelah inkubasi selama 24 jam media kemudia ditetesi dengan *Methyl Red* sebanyak 4-5 tetes. Reaksi yang akan timbul adalah jika rekasi positif maka ditandai dengan perubahan

warna pada permukaan media dari kuning menjadi warna merah. Sedangkan jika reaksi negatif yang muncul akan ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media (MacFaddin, 1985).

3.3.3. Isolasi Bakteri

Tanah yang telah diambil kemudian diencerkan dengan aquades dengan rasio 1 gr tanah diencerkan dengan 10 ml aquades. Pengenceran dilakukan selama lima kali untuk menghasilkan koloni bakteri yang tidak terlalu banyak.



Gambar 3.5. Proses isolasi bakteri dari tanah sampel

Kemudian, Mikroba pendegradasi polutan diisolasi kedalam media pengkayaan berupa medium garam minimal yang disuplementasi dengan sumber C jenis poli hidrokarbon aromatik (PAH) atau senyawa xenobiotik tertentu sebagai substrat selektif. Medium pengkayaan berguna untuk mengaktifkan mikroba yang berada dalam lingkungan dengan kondisi stres. Seleksi isolat-isolat pendegradasi hidrokarbon dilakukan metode cawan sebar (*Spread Plate*). Biakan dari media pengkayaan digores kuadran pada media garam minimal dan setelah itu disemprot sumber C berupa PAH

tertentu dalam larutan eter. Pendegradasi PAH akan menunjukkan zona jernih sekitar koloni (Saraswati, 2007)

3.3.4. Karakteristik Bakteri

3.3.3.1. Karakteristik Morfologi Bakteri

A. Pengamatan Makroskopis

1. Ukuran Koloni

Ukuran koloni bakteri diklasifikasikan dalam 4 ukuran yaitu bentuk titik, kecil, moderat atau sedang dan besar (Hajar, 2012).

2. Warna Koloni

Koloni bakteri memiliki warna tersendiri yang berbeda dengan beberapa koloni bakteri lainnya seperti warna putih, kuning, merah, ungu dan lain sebagainya (Hajar, 2012).

3. Bentuk Koloni

Koloni bakteri memiliki ciri khas yaitu Bentuk Koloninya. Klasifikasi bentuk koloni antara lain Sirkulet (bulat, bertepi), Ireguler (tidak beraturan, bertepi), dan Rhizoid (bentuk seperti akar, pertumbuhan menyebar) (Ilyina, Castillo, & Villarreal, 2003).

4. Tepi (*Margin*)

Tepi Koloni Bakteri diklasifikasikan menjadi beberapa kategori yaitu *Entire* (tepi rata), *Lobate* (tepi berlekuk), *Undulate* (tepi bergelombang), *Serrate* (tepi bergerigi), dan *Filamentous* (tepi seperti benang) (Ilyina, Castillo, & Villarreal, 2003).

5. Elevasi (ketinggian pertumbuhan koloni bakteri)

Elevasi kolni bakteri dikategorikan menjadi *Flat* (ketinggian sukar terukur, nyaris rata dengan medium), *Raised* (ketinggian nyata terlihat, namun rata pada seluruh permukaan), *Convex* (bentuk cembung seperti tetesan air), dan *Umbonate* (bentuk cembung dibagian tengah lebih menonjol) (Hajar, 2012).

B. Pengamatan Mikroskopis

1. Bentuk Bakteri

Terdapat tiga klasifikasi dalam bentuk bakteri yaitu bentuk bulat (kokus), bentuk batang (basil), dan bentuk spiral (*spirillum*). Bakteri *Pseudomonas* memiliki ciri berbentuk batang (basil), sedangkan bakteri *Acinetobacter* memiliki ciri berbentuk *cocobasil*

2. Gram Stain

Pewarnaan gram pada bakteri dapat membedakan bakteri menjadi dua kelompok yaitu bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Bakteri *Pseudomonas* dan *Acinetobacter* merupakan dua bakteri yang memiliki gram negatif.

3.3.3.2. Karakteristik Biokimia

A. Uji Katalase

Gelas objek yang telah dibersihkan ditetesi beberapa tetes larutan H_2O_2 3%. Satu ose biakan bakteri yang berumur 24 jam diletakkan di dalam tetesan tersebut. Reaksi dinyatakan positif jika timbul gelembung-gelembung udara.

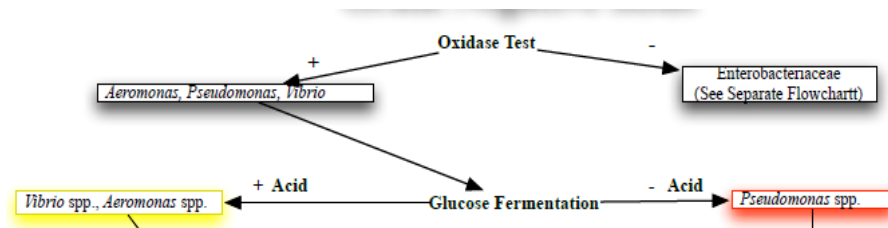
B. Uji Methyl Red

Secara aseptis diinokulasikan biakan kuman dari media Mac Conkey ke media Methyl red, diinkubasikan $37^\circ C$ selama 24 jam, kemudian ditambah 3 – 4 tetes reagen Methyl Red. Hasil positif berwarna merah. *Pseudomonas aeruginosa* pada Uji Methyl Red hasil negatif, sedangkan *Acinetobacter* memiliki hasil negatif.

C. Uji Fermentasi Glukosa

Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri dari media ke media *Phenol Red Broth*, inkubasikan $37^\circ C$. reaksi. Hasil positif ditandai terjadinya perubahan warna media merah ke kuning. *Pseudomonas* bereaksi positif dan *Acinetobacter* bereaksi negative.

Kemudian seluruh hasil pengujian biokimia disesuaikan dengan panduan yang terdapat pada *Bergey's Manual Book of Determinatif Bacteriologi*.



Gambar 4. 5. Flow Chart determinatif bakteri menurut *Bergey's Manual Book of Determinative Bacteriology* (Bergey, 1923)

3.3.5. Uji Kemampuan Isolat Bakter dalam Mendegradasi Hidrokarbon

A. Pengukuran Halozone

Uji terhadap isolat yang memiliki aktivitas pendegradasian senyawa carbon dilakukan dengan mengukur diameter *halozone* yang berwarna keunguan atau kuning. Terbentuknya *halozone* yang berdiameter besar menunjukkan koloni tersebut memiliki aktivitas atau kemampuan mendegradasi senyawa carbon. Isolat yang mampu menghasilkan *halozone* yang cukup besar ditumbuhkan kembali pada medium padat pada cawan petri. Efektifitas pendegradasian dapat di ukur dengan membandingkan diameter koloni dengan diameter halozone yang terbentuk.

Dalam penelitian (Susilowati & Syekhfani, 2014), kemampuan PSB dalam melarutkan anorganik P (*tricalcium phosphate* sebagai sumber P tunggal) di PA secara kualitatif diperkirakan dengan indeks solubilisasi P (total diameter koloni ditambah diameter zona halo terbentuk kemudian dibagi dengan diameter koloni). Derajat kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon dapat diukur menggunakan *Solubilization Index* (SI), dengan persamaan 3.1. (Susilowati & Syekhfani, 2014):

$$SI = \frac{\text{Diameter Halozone} + \text{Diameter Koloni}}{\text{Diameter Kolono}} \quad \text{Persamaan.....3.1}$$

3.2.6. Pembuatan Grafik Perbandingan Nilai SI

Data nilai index solubilisasi yang telah didapat kemudian dibandingkan antara satu sumber karbon dengan sumber karbon lainnya. Perbandingan dilakukan menggunakan grafik nilai index solubilisasi. Pembuatan grafik dalam penelitian ini menggunakan bantuan aplikasi IBM SPSS Statistic Version 25. SPSS adalah program berbasis *Windows* yang dapat digunakan untuk membuat tabel dan grafik dari data yang dimasukkan ke dalam aplikasi. SPSS biasa digunakan dalam bidang Ilmu Pengetahuan dan dalam bidang Bisnis.