

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan selama 6 (enam) bulan yaitu pada bulan Februari sampai Juli 2012 di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah media *Muller-Hilton*, media *Nutrient Agar*, agar bubuk, larutan fisiologis, logam berat Pb^{2+} dalam $Pb(NO_3)_2$, Zn^{2+} dalam $ZnCl_2$, Hg^{2+} dalam $HgCl_2$, Air fisiologis, spiritus, alkohol 70%, aluminium foil, kapas, akuades, kertas label, 7 isolat yang telah diisolasi dari lumpur Pantai Kenjeran.

3.2.2 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah cawan *Petri*, homogenitor/*shaker*, Autoklaf *Ogawa Seiki*, inkubator, penangas air, timbangan, *vortex mixer*, gelas *Beaker*, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, cuvet, AAS (*Atomic Absorption Spectrofotometer*), *colony counter*, pipet ukur, jarum ose, cawan petri, *Bunsen Burner*, gelas ukur, spatula pengaduk, pH-meter, lemari es, neraca analitik, spektrofotometer (lampiran 2).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif, tahap-tahap yang dilakukan sebagai berikut: tahap pertama yaitu uji respon tujuh bakteri terhadap logam berat Pb, Zn, dan Hg dengan variasi konsentrasi dengan tiga kali pengulangan. Tahap kedua uji pertumbuhan bakteri pilihan ke dalam media cair dengan penambahan masing-masing logam berat dengan konsentrasi 10 ppm. Tahap ketiga melakukan penghitungan persentase biodegradasi logam berat Cd, Pb, dan Hg oleh isolat terpilih.

3.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Isolat bakteri, jenis logam berat dan konsentrasi logam berat (ppm)
2. Variabel terikat : diameter daerah penghambat (mm), jumlah sel bakteri (CFU/mL), nilai penurunan konsentrasi logam berat tiap bakteri, dan pH kultur.
3. Variabel terkendali : diameter kertas cakram, volume media, pH media, kepadatan bakteri (*Optical Density*) dan media pertumbuhan mikroba, waktu inkubasi, suhu ruang.

3.5 Tahap Penelitian

3.5.1 Peremajaan Isolat

Sepuluh isolat diremajakan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Nutrient Agar* dengan metode *streak*. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam suhu ruang (28°C).

3.5.2 Persiapan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara menanamkan bakteri pada media cair *Nutrient Broth* setelah itu melakukan inkubasi selama 24-48 jam dengan penggojokan 100 rpm dengan menggunakan *shaker*. Untuk melakukan uji, 1 mL suspensi bakteri induk dimasukkan kedalam kuvet diukur kekeruhannya dengan *Optical Density* (OD) 0,5 pada λ 660 nm. Untuk mencapai OD yang ditentukan maka perlu dilakukan seri pengenceran sampai mencapai OD yang dikehendaki.

3.5.3 Uji Resistensi Logam Berat

Penelitian akan dimulai dengan persiapan media *Muller-Hilton Agar* yang telah berisi bakteri. Suspensi bakteri uji dibuat dengan mengatur kekeruhan mikroba pada nilai *Optical Density* (OD) 0,1 pada λ 660 nm. Sebanyak 1 mL suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri steril lalu dilakukan homogenisasi. Setelah itu di dalam *blank disk* steril dengan diameter 6 mm diinjeksikan sebanyak 20 μ L logam dengan berbagai konsentrasi yaitu: 1, 5, 10, ppm (Chalal *et al*, 2005; Nofiani, 2004). *Blank disk* diletakkan diatas media yang

telah berisi isolat bakteri. Inkubasi dilakukan selama 24-72 jam pada suhu kamar (Dutka and Bitton, 1989). Tingkat resistensi bakteri ditandai oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin besar diameter zona hambat, semakin kecil tingkat resistensi bakteri.

3.5.4 Uji Pertumbuhan Bakteri Terpilih dengan Penambahan Logam Berat

Setelah mengetahui bakteri terpilih yang resisten terhadap logam berat, langkah selanjutnya adalah melakukan uji pertumbuhan bakteri untuk mengetahui kemampuan hidup bakteri di dalam media cair yang berisi logam berat. Tiap-tiap isolat dengan kekeruhan pada nilai *Optical Density* (OD) 0,5 pada λ 660 nm ditumbuhkan pada media *Muller-Hilton* cair dengan pemberian masing-masing logam berat dengan konsentrasi 10 ppm. Inkubasi dilakukan selama 7x24 jam pada suhu ruang. Biakan yang sudah tumbuh diencerkan sampai tingkat 10^{-5} dan 10^{-6} , hasil pengenceran di tumbuhkan pada media *Nutrient Agar* di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Koloni yang terbentuk dihitung dengan *colony counter* dan dihitung jumlah sel mikroorganisme dalam satuan CFU/mL (Hadioetomo, 1993). Penghitungan koloni bakteri dilakukan pada hari ke-0, hari ke-3, dan hari ke-7.

3.5.5 Penghitungan Pertumbuhan Bakteri

Di dalam botol 500 mL diisi dengan *Muller-Hilton* sebanyak 150 mL yang telah ditambahkan dengan masing-masing logam berat dengan berbagai konsentrasi dan satu botol digunakan sebagai kontrol untuk tiap konsentrasi .

Setelah itu, pada tiap-tiap media di tambahkan suspensi mikroba sebanyak 5 mL. Kultur ditumbuhkan pada suhu ruang, dengan penggojokan 150 rpm selama 24 jam. Pengukuran yang dilakukan yaitu perubahan pH dan pertumbuhan biomassa sel yang diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Sudiana, 2003) pada hari ke-0 dan hari ke-7.

3.5.6 Pengukuran Konsentrasi Logam Berat dalam Media Kultur Cair

Menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrofotometer*)

Pengukuran penurunan konsentrasi logam berat dalam kultur pertumbuhan yang menggunakan isolat bakteri terpilih dilakukan dengan menggunakan AAS. Koloni isolat diinokulasikan pada media *Muller-Hilton* cair yang telah diberi logam berat sebanyak 10 ppm. Diinkubasi pada suhu kamar (24°C) selama 7 hari. Setelah itu media kultur tersebut yang telah diencerkan dengan akuades diinjeksikan pada AAS dan dilihat nilai absorbansinya. Tetapi sebelumnya dilakukan pengukuran blanko pada AAS, kemudian dilihat absorbansinya. Pengukuran logam berat dilakukan dengan panjang gelombang 217 nm dengan tipe nyala AA, memiliki sensitivitas 0,11 µg/mL, range kerja 5-20 µg/mL dan batas deteksi 0,015 µg/mL.

3.5.7 Pengukuran Penurunan Konsentrasi Logam Berat Setelah Perlakuan

(%)

Pengukuran penurunan konsentrasi logam berat dalam media kultur yang telah diberi perlakuan selama 14 hari adalah dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ Logam berat} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Kadar logam berat sebelum perlakuan

B : Kadar logam berat setelah 14 hari perlakuan

3.6 Identifikasi isolat bakteri terbaik pendegradasi logam Pb, Zn, dan Hg

Identifikasi isolat bakteri terpilih dilakukan dengan menentukan karakteristik mikroskopik dan makroskopik. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan pengecatan Gram dan mengamati bentuk dari sel isolat bakteri. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk koloni, tepi koloni, dan warna koloni. Determinasi karakter dilakukan dengan menggunakan *Oxoid Microbact Identification Kit Gram -*.

3.7 Analisis Data

Data yang akan didapat meliputi diameter zona hambat sebagai respon resistensi logam berat, hasil penghitungan jumlah CFU/mL dari uji kemampuan tumbuh isolat bakteri dalam media cair *Muller-Hilton* yang telah diberi logam berat, perubahan pH kultur, dan persentase penurunan konsentrasi logam berat hasil biodegradasi logam berat dengan menggunakan AAS. Data yang telah didapat akan dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, grafik, dan histogram.