

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus-Desember 2015 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, kompor gas, neraca digital, *autoclave* (model S-90N), *laminar air flow* (CURMA model 9005-FL), inkubator, vortex, pipet mikro, pembakar spritus, sentrifuga, tabung sentrifuga, spektrofotometri *UV Vis* Cary Win *UV* 32, mikroskop cahaya, kaca preparat, kasa, kapas, rak tabung dan jarum ose.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah NaCl, pepton, *yeast extract*, agar, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NH_4NO_3 , FeCl_3 , gliserol, LAS (Linear Alkilbenzen Sulfonat), akuades, CHCl_3 , metilen biru, buffer pospat 0,01 M, akuades, kristal violet, larutan iodin, safranin, minyak imersi, alkohol dan bakteri isolat lokal pendegradasi LAS.

C. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

Seluruh alat gelas yang digunakan dicuci, dikeringkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Sterilisasi ini bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang tidak diinginkan.

b. Pembuatan Medium Isolasi Padat

Isolasi mikroba dilakukan dengan menggunakan medium padat LAS-¼ Luria Bertani (LB) yang mengandung 20 ppm LAS. Medium ini disiapkan dengan cara menimbang 0,25 g pepton, agar 2 g, 0,125 g *yeast extract* dan 0,25 g NaCl dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan akuades sebanyak 98 mL dan 2 mL LAS 1000 ppm, lalu dihomogenkan. Medium yang telah homogen dituangkan kedalam beberapa tabung reaksi dengan volume masing-masing tabung 5-7 mL kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Tabung reaksi yang berisi medium tersebut dimiringkan dan dibiarkan memadat pada suhu kamar. Penambahan LAS pada prosedur ini berfungsi sebagai sumber karbon utama pada bakteri yang akan diisolasi.

Untuk pembuatan medium LAS-¼ LB pada cawan petri, komposisi medium sama hanya saja penuangan medium ke dalam cawan petri dilakukan setelah medium dan cawan petri disterilasi masing-masing. Penuangan dilakukan di dalam *laminar air flow* untuk menghindari kontaminasi.

c. Pembuatan Medium Kultur Cair

Terdapat 2 jenis medium kultur cair yaitu LAS- ¼LB dan Bushnell Haas.

Pembuatan medium kultur cair LAS-¼ LB dilakukan seperti pada prosedur pembuatan medium isolasi padat, akan tetapi pada pembuatan medium kultur cair tidak menggunakan agar. Sedangkan untuk pembuatan medium kultur cair

Bushnell Haas dilakukan dengan cara menimbang $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, CaCl

0.002 g, KH_2PO_4 0.1 g, K_2HPO_4 0,1 g, NH_4NO_3 0.1 g, FeCl_3 0,005 g dan

dimasukan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan akuades 98 mL dan LAS

1000 ppm 2 mL. Medium disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm.

Medium *starter* di-*shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 110 rpm sedangkan untuk medium kultur dibuat dengan komposisi yang sama, namun berbeda pada volume yang lebih banyak dan waktu inkubasi yang lebih lama menyesuaikan dengan kurva pertumbuhan.

d. Pembuatan Pereaksi MBAS (*Methylen Blue Active Substance*)

Pereaksi metilen biru dibuat dengan cara menimbang 0,5 g metilen biru kemudian di masukan ke dalam labu ukur 100 mL selanjutnya ditambah dengan akuades sampai tanda batas. Larutan metilen biru ini disimpan dalam botol gelap untuk menghindari cahaya.

2. Isolasi Bakteri Pendegradasi LAS

Isolasi dilakukan menggunakan medium cair dan padat LAS-¼ LB dengan pengenceran bertingkat dan metode *enrichment*. Sampel berupa tanah diambil dari saluran pembuangan limbah cair terkontaminasi deterjen dari Kabupaten Pesawaran, Kabupaten Lampung Selatan dan Kota Bandar Lampung. Sampel diambil menggunakan sendok dan dimasukkan ke dalam plastik kedap udara. Pengambilan sampel dilakukan pada 5 titik yang berbeda. Isolasi dengan metode pengenceran bertingkat dilakukan dengan cara menimbang 1 g sampel, kemudian disuspensikan kedalam larutan salin. Suspensi ini selanjutnya diencerkan sebanyak 10 kali pengenceran. Dari masing-masing pengenceran kemudian diambil sebanyak 200 µL dan ditanam dengan *Spread Plate Method* pada medium padat, diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam dilanjutkan dengan pemilihan koloni tunggal dengan menggunakan metode *Streak Plate*.

Isolasi dengan metode *enrichment* dilakukan dengan cara menimbang 1 g sampel tanah disuspensikan ke dalam 10 mL larutan salin kemudian dihomogenkan dan didiamkan sampai tanah mengendap. Setelah tanah mengendap, suspensi sampel diambil sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam 20 mL medium cair dan di-*shaker* selama 48 jam dengan kecepatan putaran 110 rpm. Pemindahan suspensi ke dalam medium baru dilakukan di dalam *laminar air flow* untuk menghindari kontaminasi. Setiap interval waktu 48 jam dilakukan *transfer* kultur ke medium baru dengan cara memasukkan 500 µL medium kultur bakteri ke dalam 20 mL medium baru dan diinkubasi kembali selama 48 jam pada *shaker* inkubator dengan kecepatan putaran 110 rpm pada suhu ruang. Proses ini

dilakukan secara kontinyu sampai didapatkan isolat bakteri pendegradasi LAS. Selain dilakukan *transfer* kultur pada medium cair, medium kultur yang menunjukkan perubahan turbiditas paling signifikan dilakukan penanaman pada medium padat cawan petri. Penanaman pada medium padat dilakukan dengan menggunakan metode *Spread Plate*. Sebanyak 100 μ L medium kultur dituangkan pada medium padat cawan petri dan diratakan dengan menggunakan batang L kemudian diinkubasi selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya dipindahkan ke medium padat baru menggunakan metode *Streak Plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh selanjutnya dipindahkan ke medium agar miring sebagai medium penyimpanan.

3. Penyimpanan Bakteri Pendegradasi LAS

Penyimpanan bakteri pendegradasi deterjen dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri pendegradasi deterjen pada medium LAS- $\frac{1}{4}$ LB agar miring dengan metode *zig-zag*, kemudian diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Selain disimpan dalam medium padat, kultur disimpan dalam bentuk cair dengan cara memasukan ke dalam larutan stok gliserol 40 % dengan perbandingan kultur dengan stok gliserol yaitu 1:1 dan kemudian disimpan didalam *freezer*.

4. Identifikasi Bakteri Pendegrasi LAS

Identifikasi mikroba pendegradasi deterjen dilakukan menurut Metode *Bergey's Manual Systematic Bacteriology* (1923). Pada penelitian ini dibatasi hanya dua

cara identifikasi, yakni pewarnaan gram dan uji motilitas. Dari hasil pewarnaan gram dapat diketahui bentuk dan struktur dinding sel bakteri sedangkan dengan menggunakan uji motilitas dapat diketahui apakah bakteri bergerak atau tidak.

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui bentuk dan struktur dinding sel dari bakteri. Secara aseptis, 1 ose bakteri di letakkan pada kaca preparat yang telah dibersihkan dengan alkohol, diratakan hingga membentuk lapisan tipis. Setelah kering, difiksasi dengan melewati kaca preparat di atas nyala api spritus, kemudian ditetesi dengan larutan kristal violet, setelah itu dicuci dengan air mengalir, kemudian ditetaskan larutan iodin, setelah beberapa saat dibilas kembali menggunakan air mengalir, dicuci lagi menggunakan alkohol. Setelah kering, ditambahkan beberapa tetes larutan safranin, dan didiamkan selama 1 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop.

b. Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan cara menusukkan 1 ose bakteri kedalam agar tegak, kemudian diinkubasi. Apabila terdapat serat-serat halus disekitar daerah tusukan berarti bakteri tersebut motil.

5. Pembuatan Kurva Standar LAS

Larutan standar LAS dibuat dengan rentang konsentrasi 0-2,5 ppm. Sebanyak 1 mL larutan standar LAS dengan masing-masing konsentrasi (0; 0,5; 1; 1,5; 2; dan

-2,5 ppm) di masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,1 mL metilen biru dan 0,4 mL buffer pospat 0,01 M, kemudian campuran divortex selama 3 menit dan ditambahkan klorofom 3 mL, divortex kembali selama 5 menit dan diamkan pada suhu 4 °C selama 5 menit. Setelah penambahan klorofom campuran akan membentuk 2 fasa, fasa atas merupakan fasa air dan fasa bawah merupakan fasa klorofom yang didalamnya terlarut kompleks metilen biru dengan LAS. Campuran kemudian disentrifugasi selama 4 menit, dan fasa klorofom kemudian diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan λ 655nm. Selanjutnya, absorbansi masing-masing larutan diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh nilai *slope*, *intercept*, dan R^2 .

6. Produksi Enzim

Produksi enzim dilakukan menggunakan dua jenis medium, yaitu LAS-¼ LB dan Bushnell Haas. Sebanyak 2 ose bakteri pendegradasi LAS diinokulasikan ke dalam masing-masing medium sebagai medium *starter*, di inkubasi selama 24 jam dengan *shaker* berkecepatan 110 rpm. Selanjutnya 2% dari medium di-*transfer* ke dalam medium kultur dan diinkubasi kembali selama 5 hari untuk medium Bushnell Haas dan 36 jam untuk medium ¼ LB dengan kecepatan *shaker* 110 rpm. Untuk medium Bushnell Haas medium disampling dengan interval waktu 24 jam dan untuk medium ¼ LB medium disampling dengan interval waktu 4 jam. Hasil dari sampling dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan, disentrifugasi sehingga diperoleh ekstrak kasar kultur dan ditentukan uji biodegradabilitasnya terhadap LAS.

7. Penentuan Kurva Pertumbuhan dan Uji Biodegradabilitas LAS

Penentuan pertumbuhan sel bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan sel bakteri. Sebanyak 0,3 mL kultur dan 2,7 mL akuades di masukkan ke dalam tabung reaksi, lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada panjang gelombang 600 nm.

Analisis residu LAS bertujuan untuk memantau besarnya penurunan atau degradasi LAS dalam kultur/biakan. Analisis ini dilakukan dengan secara periodik dari ekstrak kasar kultur yang disiapkan seperti tersebut di atas. Sebanyak 1 mL sampel ekstrak kasar di masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,1 mL metilen biru dan 0,4 mL buffer pospat 0,01 M, kemudian campuran divortex selama 3 menit dan ditambahkan klorofom 3 mL, divortex kembali selama 5 menit dan diamkan pada suhu 4°C selama 5 menit. Setelah penambahan klorofom campuran akan membentuk 2 fasa, fasa atas merupakan fasa air dan fasa bawah merupakan fasa klorofom yang didalamnya terlarut kompleks metilen biru dengan LAS. Campuran kemudian disentrifugasi selama 4 menit, dan fasa klorofom kemudian diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer *UV-Vis* dengan panjang gelombang 655 nm (Hayashi,1975).

D. Diagram Alir Prosedur Penelitian