

IV. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA-UNRI, selama 8 bulan.

B. Pelaksanaan Penelitian

B.1. Purifikasi dengan *plating* koloni sel tunggal

Purifikasi dilakukan dengan teknik koloni sel tunggal. Isolat *Pseudomonas* sp pengguna organoklorin ditumbuhkan pada medium SBA (*Salt Base Agar*) dengan cara goresan. Koloni bakteri yang tumbuh terpisah pada akhir goresan diambil dan dipindahkan pada medium pemeliharaan nutrisi agar miring yang ditambah 4-Klorofenol.

B.2. Uji kemampuan tumbuh *Pseudomonas* sp pada medium cair yang mengandung 4-Klorofenol

Uji kemampuan tumbuh *Pseudomonas* sp menggunakan 4-Klorofenol diuji melalui pertumbuhan pada medium cair yang meliputi beberapa langkah kerja.

B.2.1. Penyiapan inokulum dengan teknik *resting cell*

Penyiapan inokulum dilakukan dengan teknik *resting cell* (Bedard *et al.*, 1986). Isolat murni *Pseudomonas* sp ditumbuhkan dalam medium cair (SBS) yang mengandung 4-Klorofenol sebagai sumber karbon dan ditambah dengan 0,005 % ekstrak khamir. Kultur diinkubasi pada shaker secara aerob pada suhu 30°C sampai mencapai akhir fase pertumbuhan eksponensial. Pertumbuhan diukur dengan spektrofotometer (OD_{600 nm}). Setelah kultur mencapai OD_{600nm} > 0,6 dipanen dengan sentrifugasi. Pelet dicuci dua kali dengan 0,05 M buffer fosfat (pH 7,5). Pelet disuspensikan dengan buffer yang sama, 1 ml suspensi diinaktivasi dengan pemanasan pada suhu 70°C selama 20 menit. Kedua tabung tersebut ditambah 4-Klorofenol dalam acetone, dan diinkubasi selama 24-48 jam secara aerob di atas shaker pada suhu 30°C.

B.2.2. Penyiapan medium cair untuk percobaan pertumbuhan

Medium yang digunakan untuk uji kemampuan tumbuh adalah *Salt Base Solution* yang mengandung 4-Klorofenol dengan konsentrasi 10,20, dan 40 ppm sebagai sumber karbon. Dilakukan pengukuran pH (pH 7), apabila terlalu asam dititrasi dengan NaOH.

B.2.3. Percobaan pertumbuhan

Percobaan pertumbuhan diawali dengan inokulasi medium cair dengan inokulum (2.2.1) secara aseptis ke medium cair yang mengandung 4-Klorofenol 10, 20 dan 40 ppm sebagai sumber C dan digojog diatas shaker pada suhu kamar. Pertumbuhan bakteri dimonitor pada interval waktu tertentu berdasarkan kerapatan optik ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Data tersebut digunakan untuk menentukan waktu generasi serta kecepatan tumbuh spesifiknya (μ).

DIAGRAM KERJA

