

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada 4 April 2016 sampai 16 Agustus 2016. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) B dan Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, labu erlenmeyer, corong, tabung reaksi, rak tabung, spatula, batang pengaduk, kaca arloji, botol vial, cawan petri, spreader, pipet tetes, makropipet, mikropipet, tips, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *incubator shaker*, *waterbath*, sentrifuse, autoklaf, laminar, *Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)*, dan Spektrofotometer UV-Vis.

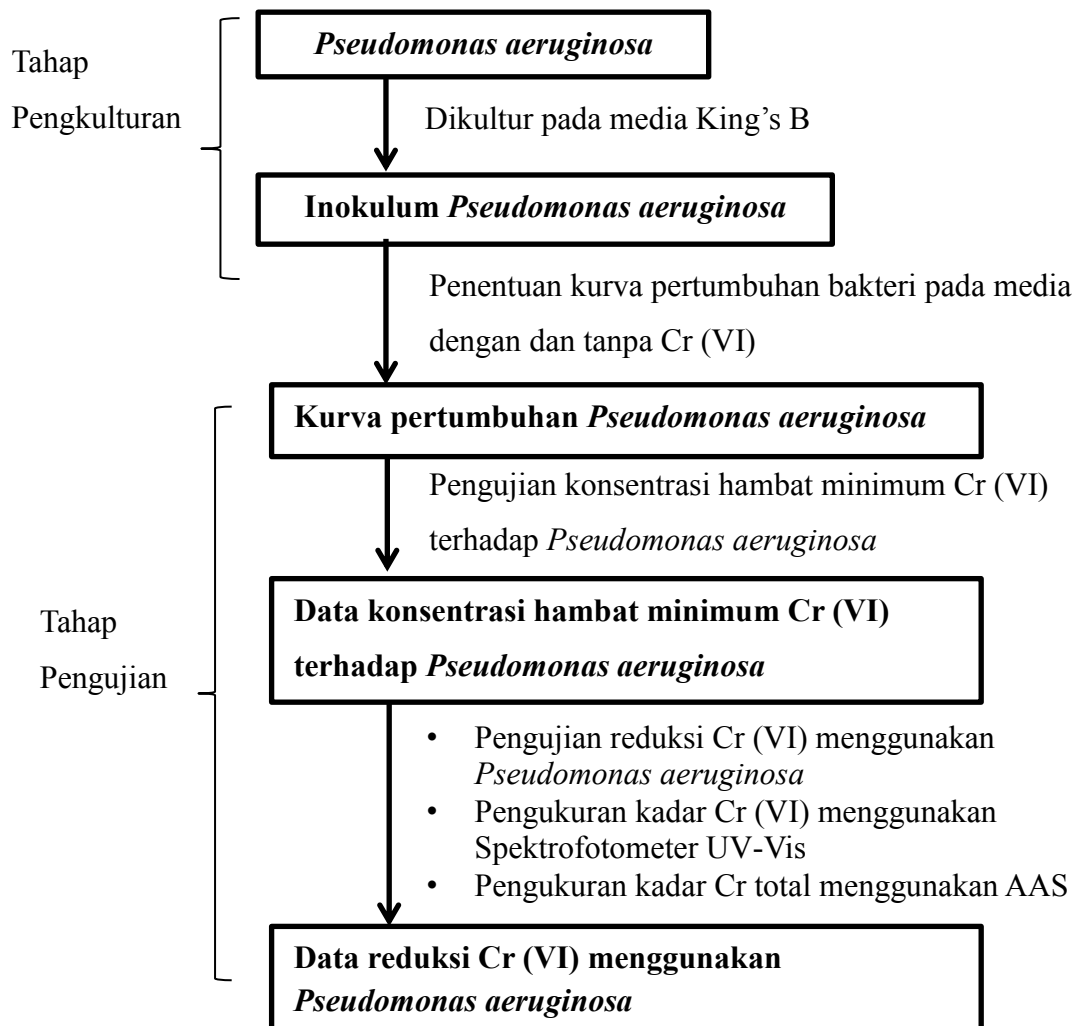
3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, etanol 70%, media King's B, kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), 1,5-difenilkarbazida dan aquades,

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan berbagai tahap yaitu tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap analisis hasil. Secara umum alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1. Tahap pertama adalah Tahap Persiapan yaitu sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan, pembiakkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Selanjutnya tahap penelitian meliputi penentuan kurva pertumbuhan bakteri dalam media King's B, uji resistensi *Pseudomonas aeruginosa* terhadap

logam Cr(VI), uji reduksi Cr (VI) oleh *Pseudomonas aeruginosa*, dan selanjutnya karakterisasi kadar logam Cr.



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.3.1 Sterilisasi alat dan bahan

Tahap persiapan meliputi proses sterilisasi alat-alat yang akan digunakan dan pembuatan medium. Proses sterilisasi dilakukan ialah sterilisasi panas lembab dengan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs. Pembuatan media tumbuh yang digunakan yaitu media King's B broth dan agar (spesifik untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa*) yang juga mengalami proses sterilisasi.

3.3.2 Pembiakkan Bakteri

Sampel yang digunakan merupakan kultur murni *Pseudomonas aeruginosa* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Institut Teknologi Bandung (ITB) yang diawetkan dalam *Cryo Buffer*. Bakteri dalam *cryo buffer* diinokulasi sebanyak satu ose ke dalam media King's B agar miring. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.3.3 Pembuatan Larutan $K_2Cr_2O_7$

Untuk pembuatan larutan stok 500 ppm, kristal $K_2Cr_2O_7$ sebanyak 0,1414 gram dilarutkan dengan aquades, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan aquades sampai tanda batas.

3.3.4 Kurva Pertumbuhan

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dikultur pada media King's B broth dengan komposisi 1/10 v/v. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam menggunakan *incubator shaker*. Setiap 2 jam dilakukan pengukuran absorbansi kultur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang $\lambda=600$ nm. Hasil pengukuran kemudian dikonversi menjadi nilai *Optical Density* (OD) mengikuti persamaan berikut :

$$OD = 2 - (\log \%T)$$

Selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan bakteri antara *Optical Density* (OD) dengan waktu. Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan pada kultur dengan dua perlakuan yaitu pada media yang ditambahkan logam Cr (VI) dan pada media tanpa Cr (VI).

3.3.5 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Logam Cr (VI) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ditumbuhkan pada cawan petri dengan metode *spread plate* pada berbagai variasi konsentrasi Cr (VI). Media King's B steril yang mengandung Cr (VI) dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian diratakan dengan cara menggoyang-goyangkan petri membentuk angka 8. Setelah media membeku, 200 μ L bakteri dimasukkan ke dalam petri kemudian disebar ke seluruh bagian cawan petri menggunakan *spreader*. Selanjutnya bakteri diinkubasi

Siska Kartikasari, 2016

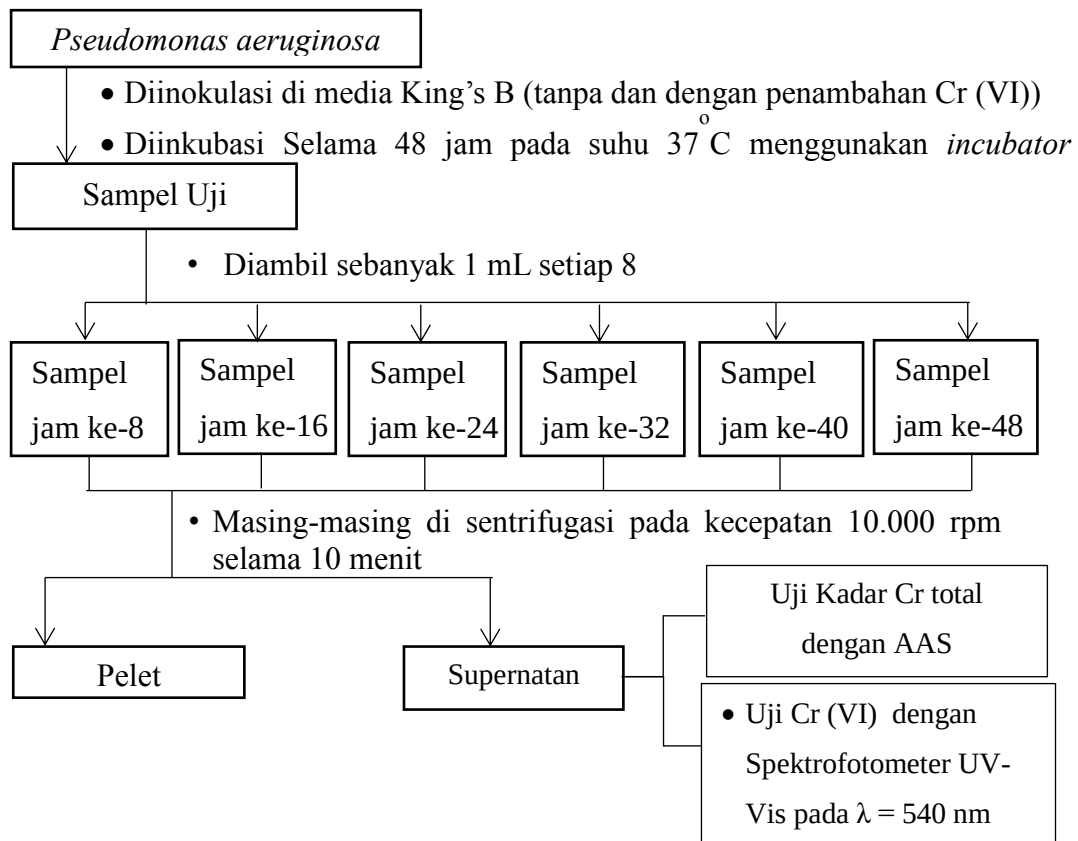
BIOREMEDIASI LOGAM KROMIUM (VI) PADA LIMBAH MODEL PENYAMAKAN KULIT
MENGUNAKAN BAKTERI PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, bakteri yang tumbuh pada masing-masing cawan petri diamati.

3.3.6 Uji Reduksi Cr (VI) menggunakan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Secara rinci pengujian kemampuan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam mereduksi Logam Cr (VI) disajikan pada Gambar 3.2 berikut ini (Ozturk *et al.*, 2012)



Gambar 3. 2 Diagram Alir Uji Reduksi Logam Cr (VI) Menggunakan Bakteri

1.3.7 Uji Kualitatif Cr (VI)

Pengujian kualitatif Cr (VI) yang tersisa di media dilakukan untuk mengetahui keberadaan Cr (VI) dari waktu ke waktu. Uji kualitatif ini dilakukan dengan menggunakan indikator 1,5-difenilkarbazid. Sampel supernatan diambil sebanyak 1 mL kemudian diadjust pH dengan menggunakan H₂SO₄ 0.2 N hingga mencapai pH ±1,3, selanjutnya ditambahkan 200 µL 1,5-difenilkarbazid dan diamati warna yang terbentuk. Hasil positif pada uji kualitatif Cr (VI) ini ditunjukkan dengan adanya kompleks berwarna ungu yang terbentuk.

1.3.8 Uji Kuantitatif Kadar Cr (VI) menggunakan Spektrofotometer

UV-Vis

Pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur kadar Cr (VI) yang terdapat pada media menggunakan instrumen Spektrometer UV-Vis. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 540 nm. Sampel media yang akan diuji ditambahkan 1,5-difenilkarbazid terlebih dahulu agar terbentuk kompleks Cr(VI)-difenilkarbazon yang berwarna ungu.

Sampel supernatan diambil sebanyak 1 mL kemudian diadjust pH dengan menggunakan H_2SO_4 0.2 N hingga mencapai pH $\pm 1,3$. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan 200 μL 1,5-difenilkarbazid dan ditambah dengan aquades sampai tanda batas. Selanjutnya sampel diukur absorbansinya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang (λ) 540 nm.

Untuk menentukan konsentrasi Cr (VI) masing-masing sampel, terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi standar kompleks Cr-difenilkarbazon. Deret standar yang dibuat yaitu pada konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ppm. Dari kurva kalibrasi tersebut diperoleh persamaan garis linier dan regresi. Koefisien korelasi atau regresi (R) lebih besar atau sama dengan 0,95 dengan intersepsi lebih kecil atau sama dengan batas deteksi. Nilai absorbansi masing-masing sampel dimasukkan ke persamaan garis kurva kalibrasi sebagai nilai y, sehingga diperoleh nilai x sebagai data konsentrasi Cr (VI).

1.3.9 Uji Kualitatif Cr (III)

Pengujian kualitatif Cr (III) yang tersisa di media dilakukan untuk mengetahui keberadaan Cr (III) dari waktu ke waktu yang menunjukkan adanya aktifitas reduksi dari Cr (VI) menjadi Cr (III). Uji kualitatif ini dilakukan dengan menambahkan larutan NaOH ke dalam sampel. Sampel supernatan diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 200 μL larutan NaOH dan diamati endapan yang terbentuk. Hasil positif pada uji kualitatif Cr (III) ini ditunjukkan dengan adanya senyawa $\text{Cr}(\text{OH})_3$ berwarna putih yang terbentuk.

1.3.10 Uji Kuantitatif Kadar Cr total menggunakan AAS.

Pengujian kadar Cr total yang tersisa pada media dilakukan menggunakan instrumen *Atomic Absorption Spectrofotometer* (AAS). Prinsip pengujian ini adalah penambahan asam nitrat bertujuan untuk melarutkan analit logam dan menghilangkan zat pengganggu yang terdapat dalam contoh uji dalam air dan air limbah dengan bantuan pemanas listrik, kemudian diukur dengan instrumen AAS menggunakan gas asetilen, C_2H_2 .

Persiapan sampel uji dilakukan dengan cara memasukkan 100 mL larutan uji yang sudah dikocok sampai homogen ke dalam gelas kimia, lalu tambahkan 5 mL asam nitrat dan panaskan menggunakan pemanas listrik sampai larutan sampel uji hampir kering. Kemudian ditambahkan 50 mL aquades, masukan ke dalam labu ukur 100 mL melalui kertas saring dan ditepatkan 100 mL dengan aquades. Selain itu disiapkan pula larutan standar Cr (VI).

Prosedur selanjutnya yaitu alat SSA dioptimalkan sesuai petunjuk penggunaan alat. Kemudian ukur masing-masing larutan standar yang telah dibuat pada panjang gelombang 357,9 nm. Buat kurva kalibrasi untuk mendapatkan persamaan garis regresi. Lanjutkan dengan pengukuran sampel uji yang sudah disiapkan.

Perhitungan konsentrasi Logam Cr total diperoleh melalui persamaan berikut ini :

$$Cr \text{ (mg/L)} = C \times fp$$

dengan pengertian:

C adalah konsentrasi yang didapat hasil pengukuran (mg/L);

fp adalah faktor pengenceran.