

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian *mix method* yakni penelitian eksperimen dan deskriptif. Metode ini dilakukan agar data yang dihasilkan saling mendukung antara satu sama lain. Desain penelitian yang digunakan untuk metode eksperimen pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana setiap perlakuan dalam percobaan dirancang dalam kondisi yang relatif homogen. Adapun prosedur penelitian dengan metode eksperimen meliputi analisis gravimetri terhadap perlakuan pada tahapan ini dilakukan sembilan kali pengulangan sesuai dengan rumus menurut Federer (1977) yaitu:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(3-1) \geq 15$$

$$(n-1)^2 \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5 \sim 9$$

Keterangan :

n = jumlah subjek perkelompok

t = jumlah kelompok perlakuan

Penelitian eksperimen pada analisis gravimetri dilakukan untuk mengetahui polutan pada tanah yang tercemar dengan menggunakan dua faktor yang berbeda, yaitu :

Faktor I adalah perbedaan konsentrasi tanah dan oli yang terdiri dari :

K1 = Konsentrasi oli 5%

K2 = Konsentrasi oli 10%

Faktor II adalah perbedaan konsentrasi NPK yang terdiri dari :

K1 = Konsentrasi NPK 0,5%

K2 = Konsentrasi NPK 1%

Konsentrasi polutan limbah 5% dan 10% pada penelitian ini disesuaikan dengan kondisi tanah tercemar oli di lingkungan sekitar, sehingga konsentrasi yang dibuatkan kurang lebih mirip dengan kondisi terhadap lingkungan tersebut. Hal ini sesuai dengan metode yang digunakan dalam penelitiannya Juliani *et al.*, (2011) namun konsentrasi limbahnya dimodifikasi. Untuk perhitungan limbah yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$5 \% \text{ oli} = \frac{5}{100} \times 5.000 \text{ gr tanah} = 250 \text{ ml}$$

$$10\% \text{ oli} = \frac{10}{100} \times 5.000 \text{ gr tanah} = 500 \text{ ml}$$

Konsentrasi pupuk NPK 0,5% dan 1% yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai nutrisi tambahan bagi bakteri dan jamur yang telah disesuaikan dengan kebutuhan dari 5 kg campuran tanah dan oli pada setiap kontainer perlakuan, sehingga diasumsikan pupuk NPK dapat menyebar secara merata berdasarkan dengan volume yang dibutuhkan. Rentang pupuk NPK pada penelitian ini disesuaikan dengan simulasi penelitian bioremediasi menggunakan konsorsium *Bacillus sp.* yang ditambahkan pupuk NPK sampai 0,5 - 0,8% (Kurniawan, 2012). Untuk perhitungan pupuk yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$0,5 \% \text{ NPK} = \frac{0,5}{100} \times 5.000 \text{ gr tanah} = 25 \text{ gr}$$

$$1\% \text{ NPK} = \frac{1}{100} \times 5.000 \text{ gr tanah} = 50 \text{ gr}$$

Variabel yang diukur adalah populasi mikroba, komposisi polutan dan berat pasta hasil gravimetri. Populasi mikroba dikaji melalui pengolahan populasi pertumbuhan mikroba secara deskriptif. Komposisi kimia hasil dari GCMS berfungsi untuk mengidentifikasi perubahan komposisi polutan selama proses bioremediasi. Perubahan komposisi tersebut dari senyawa rantai C panjang ke rantai C pendek yang menunjukkan terjadinya proses bioremediasi. Data berupa berat pasta yang menunjukkan kandungan polutan pada tanah. Selain untuk menghitung efektifitas bioremediasi data berat pasta digunakan untuk menentukan perlakuan konsentrasi NPK yang terbaik. Data biomassa pasta diuji dengan menggunakan statistika. Rancangan penelitian untuk analisis gravimetri uji yang dilakukan sebanyak 9 kali kali pengulangan seperti terdapat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1
Rancangan penelitian gravimetri

Oli dan NPK	Perlakuan		
5% + 0,5%	A1	B1	C1
	(1,1)	(1,1)	(1,1)
	A1	B1	C1
	(1,2)	(1,2)	(1,2)
	A1	B1	C1
	(1,3)	(1,3)	(1,3)
10% + 1%	A2	B2	C2
	(1,1)	(1,1)	(1,1)
	A2	B2	C2
	(1,2)	(1,2)	(1,2)
	A2	B2	C2
	(1,3)	(1,3)	(1,3)

Keterangan : A1 = Kontrol 0,5% B1 = Perlakuan C1 = Perlakuan

A2 = Kontrol 1% B2 = Perlakuan C2 = Perlakuan

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset jurusan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Untuk uji GCMS dilakukan di Laboratorium Instrumen Kimia Institut Teknologi Bandung. Penelitian ini dimulai pada bulan Februari- Mei 2019

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mikroorganisme bakteri dan jamur yang ada pada tanah tercemar oli bekas kendaraan bermotor. Sampel yang digunakan adalah konsorsium mikroba (bakteri dan jamur) yang diisolasi dari tanah yang tercemar oleh oli bekas kendaraan bermotor. Sampel oli bekas diambil dari sisa bekas *service* motor.

3.4 Alat dan Bahan

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI dan Laboratorium Instrumen Kimia Institut Teknologi Bandung (Lampiran I).

3.5 Pembuatan medium

Medium yang akan digunakan dibuat dan disiapkan. Untuk mengkultur bakteri, menggunakan medium SMSS (*Stone Mineral Salt Solution*) dengan cara melarutkan 2,5 gr CaCO_3 ; 1,25 gr NH_4NO_3 ; 0,5 gr

Na₂HPO₄·7H₂O; 0,25gr KH₂PO₄; 0,25 g MgSO₄·7H₂O; dan 0,1 g MnCl₂·7H₂O ; dan ditambahkan ekstrak ragi sebanyak 0,01 gr yang berperan sebagai sumber nitrogen tambahan. Untuk mengkultur jamur, menggunakan medium SMSS (*Stone Mineral Salt Solution*) dengan cara melarutkan 5 gr CaCO₃; 2,5 gr NH₄NO₃; 0,5 gr Na₂HPO₄·7H₂O; 1 gr KH₂PO₄; 0,5 gr MgSO₄·7H₂O; dan 2,5 gr MnCl₂·7H₂O. Setelah itu dimasukkan ke dalam satu liter akuades, dan diatur supaya pH nya tetap yaitu 6,5 (Sharpley, 1966).

3.6 Sterilisasi

Semua alat, bahan dan medium yang akan digunakan dalam penelitian ini disiapkan dan disterilisasi dengan sterillisasi basah dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Hal ini untuk menjaga alat dan bahan ini tetap steril dan tetap terjaga dari kontaminasi mikroba yang ada di sekitar.

3.7 Pengambilan sampel tanah dan oli bekas

Sampel tanah yang tercemar oli bekas diambil dari sekitar bengkel yang ada di Tasikmalaya. Sedangkan sampel tanah untuk campuran dalam reaktor diambil dari sekitar Lembang. Kemudian oli bekas kendaraan bermotor diambil dari sisa bekas *service* motor.

3.8 Isolasi bakteri dan jamur dari tanah tercemar oli

Isolasi dari tanah yang tercemar dilakukan untuk mendapatkan bakteri dan jamur untuk proses bioremediasi. Sampel tanah yang akan diisolasi dikultur dalam media cair SMSS selama 7 hari untuk mendapatkan mikroba lebih banyak. Selanjutnya pada hari ke 8 dilakukan perhitungan jumlah sel bakteri dan jamur dengan cara mengambil 1 ml dari biakan campuran kemudian dilakukan pengenceran sampel dengan 9 ml NaCl 0,85%. Setelah itu sebanyak 1 ml sampel hasil pengenceran, dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditumbuhkan pada medium SMSS (*Stone Mineral Salt Solution*) kemudian untuk bakteri dinkubasi pada suhu 37°C dan untuk jamur dinkubasi pada suhu 27°C.

3.9 Penyiapan bakteri dan jamur untuk bioremediasi

Biakan bakteri dan jamur diambil sebanyak 1 ml kemudian dilakukan pengenceran sampel pada 9 ml NaCl 0,85%. Setelah itu diinokulasikan sampai 10^{-10} inokulum untuk bakteri dan 10^{-5} untuk inokulum jamur. Total mikroba (bakteri dan jamur) yang diinokulasikan kedalam kontainer pada setiap perlakuan dihitung dengan menggunakan TPC (total *plate count*). Penanaman inokulasi mikroba ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Mamik (2004) namun dimodifikasi dalam jumlah pengencerannya. Hal ini dilakukan agar mikroba yang terlibat dalam bioremediasi pada setiap pengamatan memiliki kondisi yang sama untuk melakukan degradasi sehingga perbedaan yang terukur terjadi karena perbedaan perlakuan.

3.10 Penyiapan Reaktor Tanah

Reaktor tanah dalam penelitian ini berupa kontainer plastik berdiameter 30 cm dan tinggi 10 cm. Kontainer diisi dengan campuran sampel tanah sebanyak 5 kg dan ditambahkan oli bekas 5% dan 10%. Sampel tanah tersebut sebelumnya telah diayak sehingga tanah yang diberikan perlakuan menjadi halus. Setelah itu tanah diaduk dengan menggunakan sekop kecil agar campuran tanah dan oli bekas merata. Kemudian setiap kontainer diberikan perlakuan dengan penambahan pupuk NPK dengan merk Phonskha 1% dan 2%. Selanjutnya penanaman inokulasi mikroba yang telah disiapkan di tahap sebelumnya ditambahkan pada masing-masing reaktor. Masing-masing reaktor tanah perlakuan dibuat duplo dan terdiri dari :

1. Reaktor tanah (A1) yaitu campuran tanah dan oli + NPK 0,5%.
2. Reaktor tanah (A2) yaitu campuran tanah dan oli + NPK 1%.
3. Reaktor uji pengaruh penambahan pupuk NPK dengan variasi

sebagai berikut :

B1 : campuran tanah dan oli 5% + NPK 0,5%

C1 : campuran tanah dan oli 5% + NPK 0,5%

B2: campuran tanah dan oli 10% + NPK 1%

C2: campuran tanah dan oli 10% + NPK 1%

Semua reaktor tanah diaerasi dengan cara diaduk setiap hari. Parameter-parameter yang diuji selama proses bioremediasi adalah suhu, pH dan kelembapan pada setiap reaktor agar tetap stabil.

3.11 Perhitungan Dinamika Pertumbuhan Mikroba

Perhitungan dinamika pertumbuhan bakteri jamur dengan menggunakan total plate count. Pertama sampel tanah yang diambil untuk analisis TPC adalah sebanyak 10 gram. Sampel tanah tersebut dilarutkan dalam 30 ml medium SMSS cair steril, kemudian diambil 1 ml dari biakan SMSS cair lalu dilakukan pengenceran sampel dengan menggunakan 9 ml NaCl 0,85% sampai 10^{10} sel/ ml untuk bakteri, sedangkan untuk jamur sampai 10^5 sel/ ml. Selanjutnya 1 ml sampel hasil pengenceran, dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditumbuhkan di media SMSS yang ditambahkan *bacto agar* 2% untuk dihitung jumlah populasinya (Gaudy, 1980). Perhitungan mikroba dalam penelitian ini dilakukan setiap 3 hari sekali selama 3 minggu.

3.12 Analisis Gravimetri

Teknik gravimetri adalah teknik untuk mengurai kandungan polutan pada tanah. Berdasarkan berat polutan yang didapatkan melalui proses ekstraksi dengan larutan n heksan. Proses ekstraksi ini dilakukan dengan cara mengambil 10 gram tanah dan dimasukkan kedalam 20 ml n heksan lalu di shaker selama 24 jam. Setelah 24 jam larutan tersebut di saring untuk memisahkan tanah dengan larutan ekstraksi. Kemudian larutan n heksan diuapkan lalu yang tersisa hanya ekstrak yang berupa pasta minyak. Setelah itu hasil pasta yang didapatkan ditimbang untuk menentukan biomassa polutan. Analisis gravimetri ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Juliani *et al.*, (2011) namun dimodifikasi volume larutan ekstraksinya.

Untuk menghitung biomassa polutan dengan cara :

$$\text{Kadar polutan oli bekas (gr)} = (W2 - W1)$$

Keterangan:

W1 = berat gelas kimia kering (gr)

W2 = berat gelas kimia dengan kadar polutan yang diperoleh (gr)

Hasil pengukuran TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) terbaik kemudian dianalisa dengan menggunakan GCMS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) untuk mengetahui senyawa apa saja yang hilang dan konsentrasinya selama proses pertumbuhan terjadi.

3.13 Analisis kandungan senyawa hidrokarbon

Analisis kandungan hidrokarbon ini dilakukan dengan menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) untuk mengetahui perubahan komponen oli bekas setelah proses degradasi (Nugroho, 2006). Uji ini dilakukan di Laboratorium Instrumen Kimia Institut Teknologi Bandung. Pada tahap ini GC-MS merupakan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu kromatografi gas (GC) untuk menganalisis jumlah senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa analit (Fowlsh, 1998).

Fase pembawa dari GCMS adalah berupa gas (He). GC-MS adalah alat yang terdiri dari dua gabungan yaitu GC dan MS, setelah zat terpisah kemudian akan masuk ke dalam MS. Setiap puncaknya diidentifikasi untuk menentukan struktur senyawa tersebut (Surtikanti, 2011). Sampel yang dianalisis adalah sampel oli bekas dengan konsentrasi 5% polutan kendaraan bermotor dengan cara melarutkan 1ml oli bekas dan hasil pasta gravimetri di hari ke 21 yang terbaik dilarutkan ke dalam 50 ml n heksan. Kemudian diambil 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung eppendorf lalu di sentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Setelah itu terbentuklah dua fase yaitu *supernatant dan pellet*. Selanjutnya *supernatant* dipindahkan ke dalam botol vial untuk dilakukan pengujian GCMS. Sampel dianalisis menggunakan mesin GC-MS Shimadzu qp ultra 2010 yang dilengkapi dengan kolom RTX-5MS dengan gas pembawanya helium dengan laju aliran 1,0 mL/menit. Setelah itu 1 μ L disuntikkan dalam mode splitless pada suhu injeksi 250°C. Program suhu kolom ditetapkan sebagai berikut: suhu awal 50°C ditahan selama 2 menit, 10°C/menit meningkat menjadi 120°C, diikuti oleh peningkatan 4°C/menit hingga 310°C (ditahan selama 15 menit). Untuk kondisi spektrometri massa adalah sebagai berikut:

EI sumber arus 70 Ev, rentang massa dalam 45 ~ 600 amulet, penggali tegangan 1200 V, temperatur sumber ion 230°C, dan suhu antarmuka 280°C (Adhikari, 2017).

3.14 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk uji eksperimen menggunakan program SPSS 22 *for windows* sedangkan untuk uji analisis data uji deskriptif melalui perubahan komposisi kimia polutan oli bekas kendaraan bermotor.

3.15 Analisis Populasi Bakteri dan Jamur

Data hasil populasi bakteri dan jamur dianalisis dengan cara mengisolasi setiap 3 hari sekali selama 15 hari untuk mengetahui signifikansi pengaruh konsentrasi NPK dan konsentrasi limbah oli bekas kendaraan bermotor. Adapun tahapan uji yang dilakukan sebagai berikut:

1. Uji Normalitas (Kolmogorov smirnov)

Uji normalitas dilakukan terhadap masing-masing perlakuan dengan konsentrasi NPK dan konsentrasi limbah oli bekas yang berbeda. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui sebaran data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik. Pengambilan keputusannya jika nilai signifikansi $\alpha \geq 0,05$ maka H_0 diterima sedangkan jika nilai signifikansi $\alpha \leq 0,05$ maka H_1 diterima.

2. Uji Homogenitas (*Lavene statistic*)

Uji homogenitas dilakukan terhadap masing-masing perlakuan dengan konsentrasi NPK dan konsentrasi limbah oli bekas yang berbeda. Variansi data dapat diketahui melalui uji homogenitas untuk mengetahui data menyebar secara normal atau tidak pada uji statistik. Uji statistik parametrik dapat dilakukan apabila sebaran data normal dan homogen. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka harus dilakukan uji statistik no- parametrik.

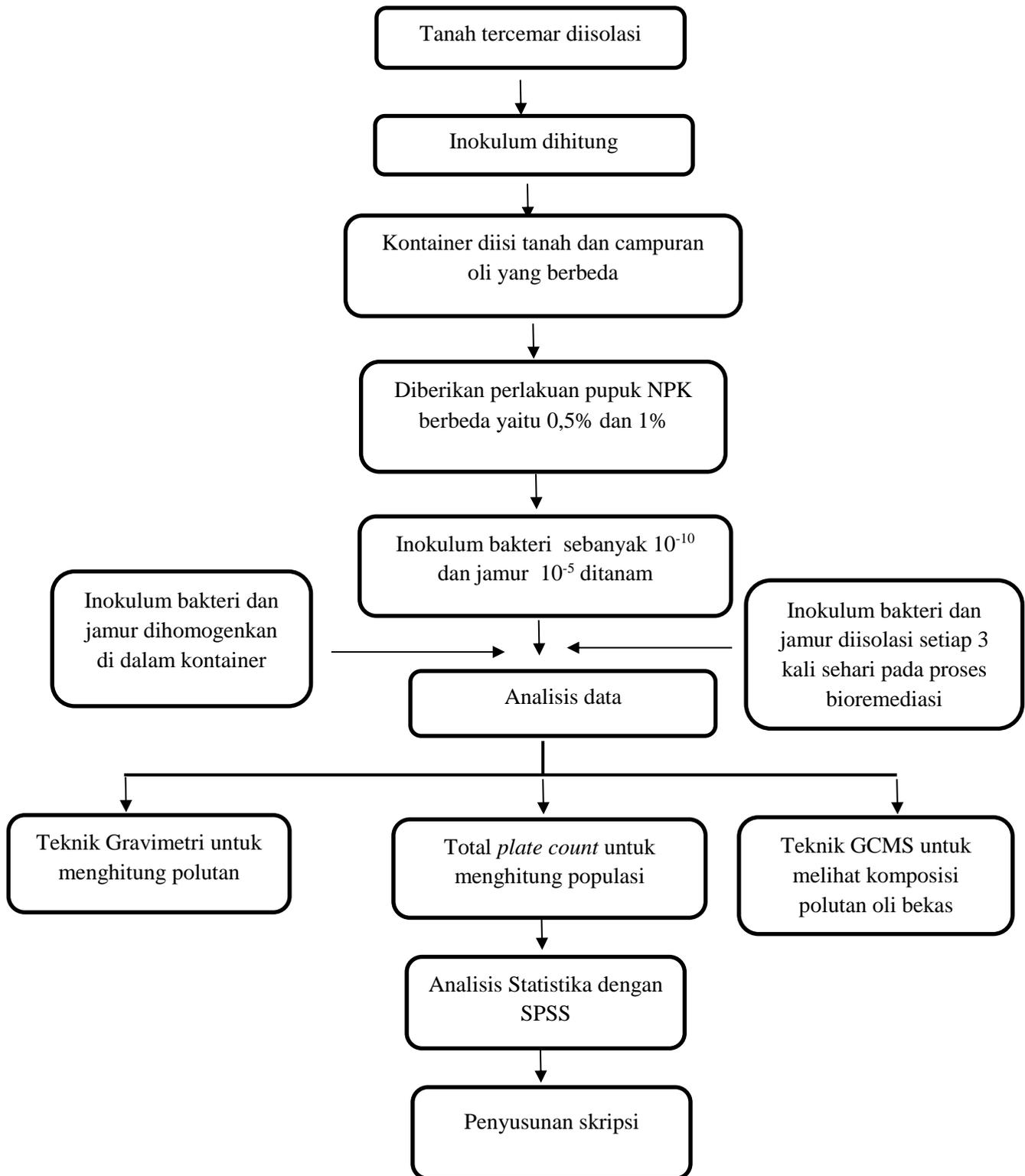
3. Uji *Wilcoxon*

Uji *Wilcoxon* ini dilakukan karena data pada penelitian ini tidak normal dan homogen. Maka dari itu dilakukan uji *wilcoxon*. Uji ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rata-rata dua

sampel yang saling berhubungan. Pengambilan keputusannya jika nilai signifikansi $\alpha \leq 0.05$, maka rata-rata data sebelum dan sesudah perlakuan berbeda secara signifikan. Sedangkan jika nilai signifikansi $\alpha \geq 0.05$, maka rata-rata data sebelum dan sesudah perlakuan tidak berbeda secara signifikan.

3.16 Alur Penelitian

Alur penelitian pada efektifitas bioremediasi limbah oli pada media tanah dengan menggunakan NPK terdapat pada Gambar 2.3 di bawah ini :



Gambar 2.3 Alur Penelitian