

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Dimana pendekatan kualitatif yaitu analisis GCMS dan pendekatan kuantitatif yaitu perhitungan gravimetri dan pertumbuhan bakteri.

### **3.2. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah mikroorganisme bakteri yang ada pada tanah tercemar oli bekas kendaraan bermotor. Sampel yang digunakan adalah bakteri yang teridentifikasi oli bekas kendaraan bermotor, serta oli yang ditambahkan pada medium perlakuan.

### **3.3. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Penelitian mulai dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2020.

### **3.4. Alat dan Bahan Penelitian**

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 Universitas Pendidikan Indonesia (Lampiran I).

### **3.5. Pembuatan Medium**

Media yang digunakan untuk uji degradasi isolat bakteri menggunakan media *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS), yang terdiri dari  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , lalu ditambah ekstrak ragi 0,01% (b/v) dan selanjutnya media disebut SMSSe untuk memudahkan penyebutan (Sharpley, 1966). Penambahan ekstrak ragi berperan sebagai sumber nitrogen dalam bentuk asam amino dan *growth factor* untuk tambahan media. Untuk media SMSSe cair terdiri dari 0,25 gram  $\text{CaCO}_3$ ; 0,125 gram  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,05 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,025 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 gram  $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dengan ditambahkan ekstrak ragi sebanyak 0,01% (b/v) atau setara dengan 0,01 gram yang dilarutkan dalam 100 ml aquades steril, sedangkan untuk media padat ditambahkan *bacto agar* 2% supaya medium menjadi padat. Kemudian oli ditambahkan sebagai media selektif dan sumber karbon dengan pH mencapai

6,8 – 7 (Nababan, 2008). Masing-masing media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, dan tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit.

### **3.6. Sterilisasi**

Sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dengan cara membungkus semua alat yang akan digunakan dengan kertas yang rapat dan dimasukkan kedalam plastik. Bahan yang akan digunakan juga dimasukkan kedalam botol kaca lalu selanjutnya dibungkus kertas dengan rapat dan dimasukkan plastik. Sterilisasi dilakukan dengan cara memasukan semua alat dan bahan yang sudah disiapkan kedalam autoklaf selama 15 – 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

### **3.7. Peremajaan Inokulum**

Biakan murni isolat bakteri yang telah teridentifikasi di subkultur ke medium KNA baru dengan cara mengambil 1 ose dari masing-masing isolat bakteri murni kedalam medium KNA yang baru secara aseptik. Kemudian kultur baru tersebut disimpan dalam lemari pendingin.

### **1.8. Pewarnaan Gram Bakteri**

Pewarnaan gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan selama penelitian merupakan bakteri yang sama dengan bakteri yang telah teridentifikasi pada penelitian sebelumnya, dan untuk memastikan bahwa tidak ada kontaminasi oleh mikroorganisme lain seperti jamur. Pewarnaan gram bakteri dilakukan dengan cara Akuades ditetaskan pada kaca objek lalu ditambahkan 1 ose biakan sampel, selanjutnya difiksasi di atas api. Sediaan ditetesi pewarna kristal violet dan dibiarkan 1 menit, cuci dengan air mengalir, selanjutnya ditetesi lugol diamkan 1 menit dan dicuci lagi dengan air mengalir. Alkohol 96% ditetaskan dan dibiarkan selama 10 – 20 detik, cuci pada air mengalir dan safranin ditambahkan lalu biarkan 30 detik selanjutnya dicuci lagi dengan air mengalir. Tahapan selanjutnya yaitu sediaan dikeringkan dengan menggunakan kertas isap, minyak imersi ditetaskan untuk selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Apabila hasil pewarnaan menunjukkan bakteri berwarna merah maka bakteri termasuk bakteri gram negatif, sedangkan bila bakteri berwarna ungu maka bakteri termasuk pada bakteri gram positif (Fitri & Yasmin, 2011).

### 3.9. Pengukuran Pertumbuhan Isolat Bakteri

Pertumbuhan ialah pertambahan teratur semua komponen suatu mikroorganisme. Pertumbuhan jasad renik dapat diukur berdasarkan konsentrasi sel (jumlah sel persatuan isi biakan) atau densitas sel (berat kering dari satuan sel-sel biakan). Menghitung densitas dapat dilihat dari nilai absorbansi suatu biakan (Khodijah, *at al.*, 2006).

Pertumbuhan isolat bakteri diukur berdasarkan *optical density* pada panjang gelombang 620 nm setiap 2 jam sekali selama 24 jam masa inkubasi. Sampel biakan bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1000 $\mu$ l kemudian diencerkan dengan aquades hingga 2 ml dalam kuvet dan dideteksi absorbansi warnanya dengan menggunakan spektrofotometer yang telah dikalibrasi terlebih dahulu. Larutan blanko yang digunakan untuk kalibrasi spektrofotometer adalah medium KNA yang diencerkan dengan pengenceran yang sama dengan sampel.

### 3.10. Pengayaan Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Biakan bakteri murni diambil 1 ose kemudian dilakukan aktivasi sampel pada 10 ml SMSSe cair. Isolat tersebut di *shaker* selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian isolat tersebut dipindahkan kedalam medium SMSSe cair baru 90 ml untuk proses pengayaan. Isolat tersebut di *shaker* selama 15 hari dan diambil 1 ml setiap 3 hari sekali untuk dilakukan perhitungan pertumbuhan bakteri. Konsentrasi oli pada perlakuan ini ditentukan dalam konsentrasi TPH 10%. *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) merupakan pengukuran konsentrasi pencemar hidrokarbon minyak bumi dalam tanah atau serta seluruh pencemar hidrokarbon minyak dalam suatu sampel tanah (Zhyahrial, *et al.*, 2014). Oleh karena itu remediasi dengan bakteri lokal pada limbah oli bekas kendaraan bermotor ini juga dilihat kandungan *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) yang ada pada limbah. Penelitian mengacu pada Nugroho (2006) namun dimodifikasi dalam lamanya masa inkubasi. Hal ini dilakukan agar bakteri yang terlibat dalam bioremediasi pada setiap pengamatan memiliki kondisi yang sama untuk melakukan degradasi sehingga perbedaan yang terukur terjadi karena perbedaan perlakuan.

### 3.11. Perhitungan Dinamika Pertumbuhan Bakteri

Perhitungan dinamika pertumbuhan bakteri dengan menggunakan *Total Plate Count* (TPC). Isolat bakteri diambil masing-masing sebanyak 1 ml dari biakan SMSSe cair lalu dilakukan pengenceran sampel dengan menggunakan 9 ml aquades

steril sampai  $10^{-7}$  sel/ml. Selanjutnya 1 ml sampel hasil pengenceran, dimasukkan kedalam cawan petri steril dan ditumbuhkan di media SMSS yang ditambahkan *bacto agar* 2% untuk dihitung jumlah populasinya (Gaudy, 1980). Perhitungan bakteri dalam penelitian ini dilakukan setiap 3 hari selama 15 hari.

### 3.12. Pengukuran Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) menggunakan Analisis Gravimetri

Parameter yang digunakan dalam proses biodegradasi limbah minyak bumi adalah *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH). Keberhasilan suatu proses biodegradasi limbah minyak bumi ditentukan berdasarkan kandungan akhir dari kadar minyak bumi/TPH. TPH cair dapat juga dijadikan tolak ukur dalam degradasi limbah minyak bumi. Semakin tinggi nilai TPH cair oli bekas menunjukkan semakin terdispersinya oli ke dalam air, yang memudahkan bakteri untuk mendegradasi. Proses ekstraksi ini dilakukan dengan cara mengukur volume akhir dari oli pada setiap botol. Kemudian oli tersebut ditimbang dan ditambahkan dengan n-heksan sampai larutan tersebut mencapai 10% dari volume sisa oli tersebut. Kemudian larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring lalu diuapkan di *waterbath* dengan suhu  $70^{\circ}\text{C}$  sampai n-hexsan menguap dan hanya pasta minyak yang tersisa. Setelah itu hasil pasta yang didapatkan ditimbang untuk menentukan biomassa polutan. Analisis gravimetri ini mengacu pada penelitian Yuliana, *et al.*, (2019) dan Juliani, *et al.*, (2011) namun dimodifikasi volume larutan ekstraksinya. Persentase oli bekas yang dikonsumsi oleh mikroba dihitung secara gravimetri sebagai berikut (Basuki, 2011):

$$\text{konsumsi (\%)} = \frac{\text{berat awal oli} - \text{berat akhir oli}}{\text{berat oli awal}} \times 100\%$$

### 3.13. Analisis Kandungan Senyawa Hidrokarbon

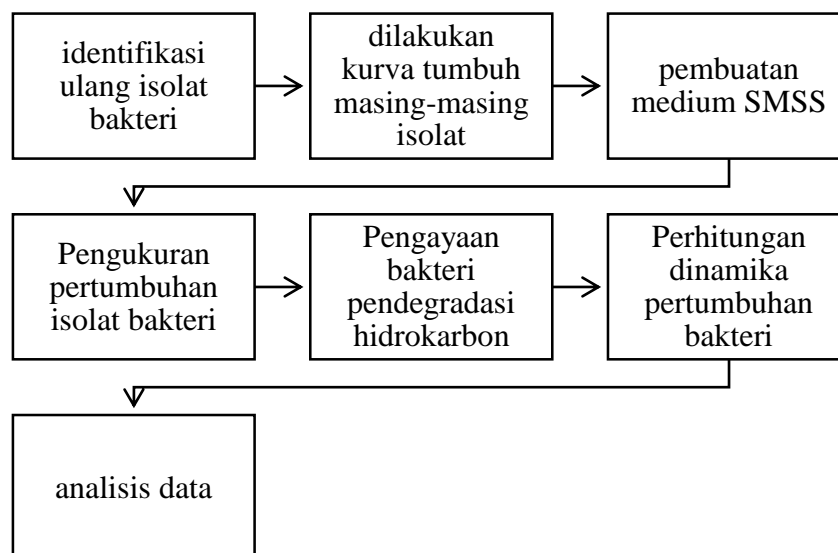
Analisis kandungan hidrokarbon ini dilakukan dengan menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) untuk mengetahui perubahan komponen oli bekas setelah proses degradasi (Nugroho, 2006). Uji ini dilakukan di Laboratorium Instrumen Kimia Universitas Pendidikan Indonesia. Pada tahap ini GC-MS 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 (Fowlis, 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 10% polutan kendaraan bermotor dengan cara melarutkan 1 ml oli bekas dan hasil pasta gravimetri di hari ke 15 yang terbaik dilarutkan ke dalam 4 ml n-heksan. Selanjutnya larutan 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 $\mu$ 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).

### 3.14. Bagan Eksperimen

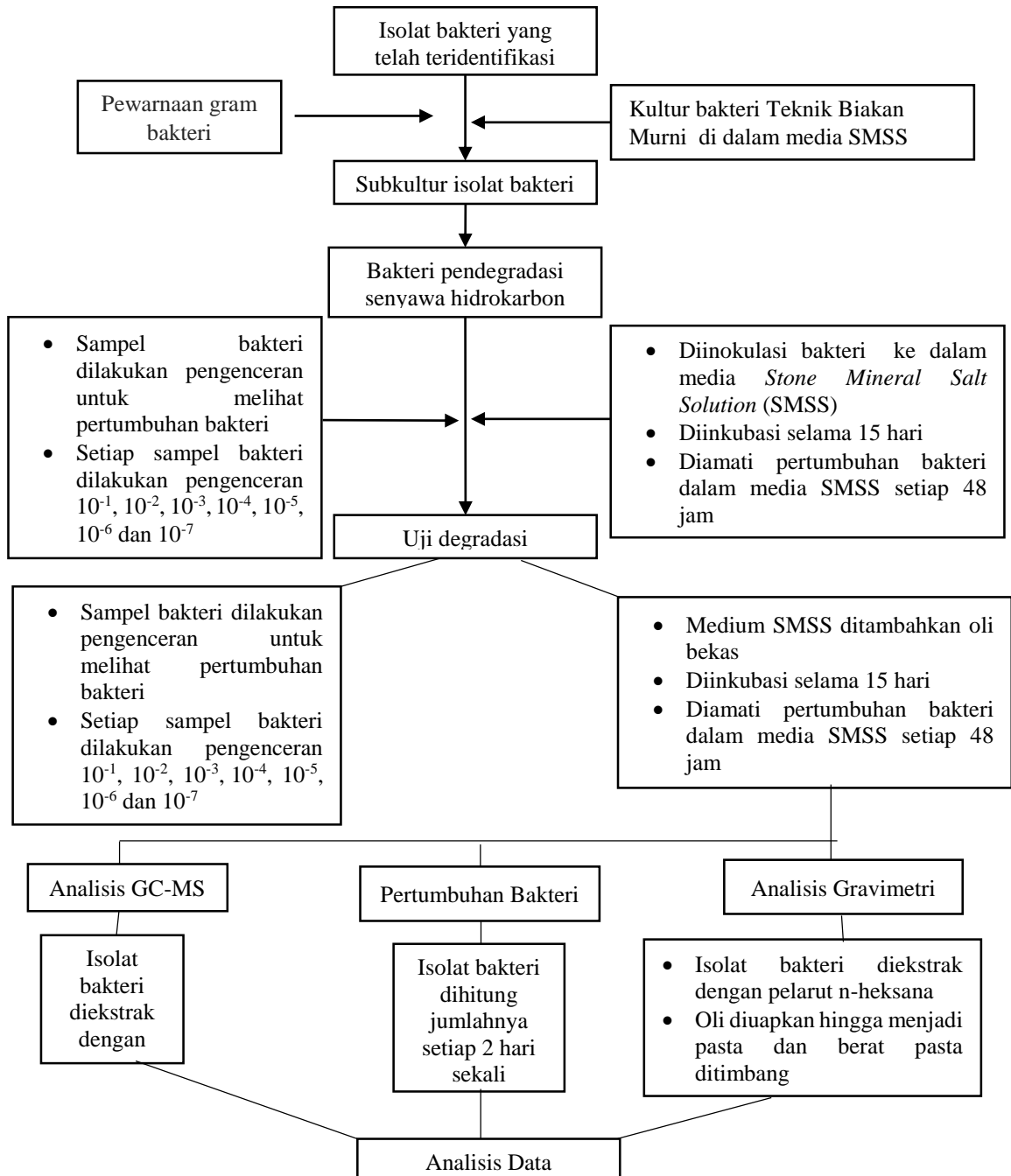
Prosedur penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1 dibawah ini :



Gambar 3.1 Bagan Eksperimen

### 3.15. Alur Penelitian

Alur penelitian pada proses bioremediasi limbah oli pada media SMSS dengan menggunakan limbah oli bekas terdapat pada gambar 3.2 dibawah ini :



Gambar 3.2. Alur Penelitian

