

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif pendekatan kuantitatif dan kualitatif dimana penelitian ini mendeskripsikan peranan konsorsium bakteri dalam mendegradasi oli bekas kendaraan bermotor. Metode deskriptif adalah suatu metode yang digunakan untuk menggambarkan atau menganalisis suatu hasil penelitian (Sugiyono, 2005). Tujuan dari penelitian deskriptif ini adalah untuk membuat deskripsi atau gambaran secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antarfenomena yang diselidiki (Nazir, 1988).

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai bulan Maret tahun 2020 di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Uji GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) dilakukan di Laboratorium Instrumen Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah enam isolat bakteri hasil isolasi dari tanah yang tercemari oleh oli bekas kendaraan bermotor. Sampel yang digunakan adalah konsorsium bakteri berasal dari keenam isolat bakteri yang berpotensi sebagai remediator tanah yang tercemar oleh bekas kendaraan bermotor. Sampel oli bekas di ambil dari limbah oli bekas kendaraan bermotor yang berasal dari Sumedang.

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan di dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi dan Laboratorium Instrumen Departemen Pendidikan Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia yang terdapat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2 (Lampiran 1).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahapan Persiapan

Tahapan ini meliputi persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan. Alat dan bahan yang akan digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Proses sterilisasi ini adalah suatu program untuk mematikan semua organisme yang terdapat di dalam suatu benda. Alat yang akan disteriliasi dibungkus menggunakan kertas bekas serta dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dengan rapat agar tetap kering. Bahan yang akan disterilisasi dimasukkan ke dalam wadah kaca bersih dan diberi sumbat sebagai penutupnya, kemudian dibungkus menggunakan kertas tahan panas. Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.5.2 Pembuatan Media *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS)

Media *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) terdiri dari 5 gram CaCO_3 , 2,5 gram NH_4NO_3 , 1 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 gram KH_2PO_4 , 0,5 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 0,2 gram $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan di dalam 1 liter akuades (Sharpley, 1966). Ekstrak ragi sebanyak 0,01% (b/v) ditambahkan ke dalam media SMSS sebagai sumber nitrogen tambahan. Media ditambahkan minyak bumi sebanyak 2% (b/v) sebagai sumber karbon. PH media adalah 6,8-7 (Aditiawati dan Indriani, 2001).

Media SMSS cair yaitu dengan cara ditimbang CaCO_3 0,5 gram, NH_4NO_3 0,25 gram, Na_2HPO_4 0,1 gram, KH_2PO_4 0,05 gram, MgSO_4 0,05 gram, MnCl_2 0,02 gram dan ekstrak ragi 0,02 gram dilarutkan ke dalam 200ml akuades. Pembuatan media SMSS padat sama dengan pembuatan media SMSS cair hanya saja pada media SMSS padat diberi tambahan bacto agar sebanyak 2% dari jumlah keseluruhan media SMSS yang dibuat. Ekstrak ragi sebanyak 0,01% ditambahkan ke dalam media SMSS sebagai sumber nitrogen dalam bentuk asam amino dan *growth factor* tambahan. Kemudian oli ditambahkan pada media sebagai media selektif dan sumber karbon. Semua bahan dicampurkan hingga homogen di atas *hotplate*. Media disterilisasikan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit.

Fitri Widiyanti, 2020

**PERANAN KONSORSIUM BAKTERI SEBAGAI REMEDIATOR DALAM PROSES
DEGRADASI LIMBAH OLI BEKAS KENDARAAN BERMOTOR**

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

3.5.3 Peremajaan Isolat Bakteri

Isolat bakteri tumbuh dengan cepat, sehingga harus diremajakan dalam satu medium yang mengandung nutrisi untuk kebutuhan pertumbuhannya. Caranya dengan memindahkan ulang isolat ke dalam medium agar miring steril secara aseptik dengan jarum ose kemudian diinkubasi pada suhu sesuai habitat asal selama 2x24 jam (Dahlan, , 2018).

Isolat bakteri dan bakteri terlebih dahulu ditumbuhkan pada media untuk mendapatkan koloni terpisah dengan teknik cawan sebar. Teknik biakan murni (TBM) di dalam media kaldu *nutrient* agar (KNA) untuk mendapatkan beberapa jenis bakteri yang lebih murni serta tidak terkontaminasi mikroorganisme lain. Keenam isolat masing-masing diremajakan dengan cara mengambil 1-2 ose isolat bakteri dan dipindahkan ke media agar miring KNA steril, kemudian di inkubasi.

3.5.4 Kurva Tumbuh Bakteri

Kurva pertumbuhan ialah suatu informasi mengenai fase hidup suatu bakteri fase-fase hidup bakteri pada umumnya meliputi fase adaptasi, fase eksponensial atau fase pertumbuhan eksponensial, fase stationer, dan fase kematian. Kurva pertumbuhan digunakan untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan sel dan pengaruh lingkungan terhadap kecepatan pertumbuhan. Langkah awal untuk mengetahui kurva pertumbuhan bakteri ialah dengan mengisolasi bakteri (Sharah, *et al.*, 2018). Pembuatan kurva pertumbuhan merupakan bagian yang penting dari suatu penelitian karena dapat menggambarkan karakteristik pertumbuhan bakteri. Selain itu, perhitungan waktu generasi juga diperlukan untuk mengetahui prediksi populasi setiap mikroorganisme dalam jangka waktu yang sama dengan keaktifannya dalam proses metabolisme (Fardiaz, 1992).

Langkah-langkah pembuatan kurva pertumbuhan bakteri yaitu sebanyak satu ose dari kultur bakteri yang telah mengalami peremajaan pada media tabung miring MRS (*de Man Rogosa and Sharpe*) Broth agar diinokulasi ke dalam Erlemeyer berisi 100 ml MRS Broth steril dan diinkubasi. Pengamatan terhadap nilai *Optical Density* (OD) dilakukan setiap 2 jam pengamatan dari jam ke 0

Fitri Widiyanti, 2020

**PERANAN KONSORSIUM BAKTERI SEBAGAI REMEDIATOR DALAM PROSES
DEGRADASI LIMBAH OLI BEKAS KENDARAAN BERMOTOR**

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

sampai jam ke 24 (Dahlan, et all., 2017). Pengukuran OD dilakukan dengan metode langsung berdasarkan turbiditas dengan cara mengambil sebanyak 5 ml kultur pada media MRS Broth kemudian diamati nilai ODnya pada spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm (Yuliana, 2008).

3.5.5 Tahapan Adaptasi dan Aktivasi

Tahapan adaptasi ini merupakan suatu upaya untuk mengadaptasikan isolat bakteri dalam media SMSS sebagai larutan basal yang ditambah dengan 1% ekstrak ragi. Ekstrak ragi adalah suatu bahan yang mengandung sumber nitrogen organik yang siap digunakan yaitu asam-asam amino dan beberapa vitamin seperti vitamin B serta senyawa-senyawa karbon (Pelczar dan Chan , 1986). Keenam isolat bakteri masing- masing diambil sebanyak 1 ose kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media SMSS cair. Isolat dihomogenkan dan diinkubasi menggunakan shaker selama 20 jam pada suhu 37°C. Setelah beradaptasi dengan media SMSS cair dilakukan aktivasi bakteri sampai masing-masing dari keenam isolat bakteri masuk ke fase log.

1.5.6 Penanaman Konsorsium Bakteri

Keenam isolat bakteri yang masing-masing telah memasuki fase log dibuat menjadi tujuh konsorsium bakteri dengan komposisi yang berbeda. Konsorsium bakteri pertama terdiri dari enam bakteri yaitu *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Listeria murrayi*, *Enterobacter* sp., *Azomonas* sp., dan *Alcaligenes* sp., konsorsium bakteri kedua terdiri dari *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Listeria murrayi*, *Enterobacter* sp., dan *Azomonas* sp., konsorsium bakteri ketiga terdiri dari *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Listeria murrayi*, *Enterobacter* sp. , dan *Alcaligenes* sp., konsorsium bakteri keempat terdiri dari *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Listeria murrayi*, *Azomonas* sp., dan *Alcaligenes* sp., konsorsium bakteri kelima terdiri dari *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Enterobacter* sp., *Azomonas* sp., dan *Alcaligenes* sp., konsorsium bakteri keenam terdiri dari *Bacillus subtilis*, *Listeria murrayi*, *Enterobacter* sp., *Azomonas* sp., dan *Alcaligenes* sp., dan konsorsium bakteri ketujuh terdiri dari

Bacillus pumilus, *Listeria murrayi*, *Enterobacter* sp., *Azomonas* sp., dan *Alcaligenes* sp.

Sebanyak 10ml masing-masing konsorsium bakteri ditanam pada 90ml media SMSS cair. Konsorsium bakteri diinkubasi selama 15 hari untuk mengamati pertumbuhan dan perkembangan jumlah bakteri di dalam media SMSS. Pada pengamatan ini dilakukan dua perlakuan yaitu pengamatan pertumbuhan dan perkembangan jumlah bakteri di dalam media SMSS dan pengamatan pertumbuhan jumlah bakteri di dalam media SMSS yang ditambahkan dengan oli bekas kendaraan. Konsorsium bakteri sebanyak 10ml dimasukkan ke dalam botol berisi 90ml media SMSS dan ditambahkan 10% limbah oli bekas kendaraan bermotor. Limbah oli yang digunakan adalah limbah oli yang berasal dari oli sepeda motor. Hal ini dikarenakan penggunaan sepeda motor di Indonesia dianggap penggunaan kendaraan bermotor paling banyak di antara kendaraan lainnya. Selama 15 hari diinkubasi di atas shaker pada suhu ruang dengan kecepatan 100 rpm. Konsorsium diamati setiap tiga hari sekali yaitu dengan dilakukan *Total Plate Count* (TPC) pada hari ke -3, hari ke-6, hari ke-9, hari ke-12, serta hari ke-15.

1.5.7 Perhitungan Jumlah Pertumbuhan Konsorsium Bakteri

Perhitungan jumlah pertumbuhan konsorsium bakteri menggunakan metode perhitungan *Total Plate Count* (TPC) pada hari ke -3, hari ke-6, hari ke-9, hari ke-12, serta hari ke-15. Konsorsium diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah mengandung 9 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan vortex sebagai stok pengenceran 10^{-1} , kemudian dilakukan pengenceran dengan cara yang sama sehingga diperoleh suspensi konsorsium bakteri pengenceran 10^{-9} . Setiap pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9} ditanam pada medium SMSS dengan metode penanaman cawan sebar. Konsorsium bakteri diinkubasi dalam inkubator bakteri selama 24 jam kemudian dihitung jumlah bakteri menggunakan metode TPC.

1.5.8 Analisis Gravimetri

Fitri Widiyanti, 2020

PERANAN KONSORSIUM BAKTERI SEBAGAI REMEDIATOR DALAM PROSES DEGRADASI LIMBAH OLI BEKAS KENDARAAN BERMOTOR

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

Analisis Gravimetri adalah suatu bentuk analisis kuantitatif yang berupa penimbangan, yaitu suatu proses pemisahan dan penimbangan suatu komponen dalam suatu zat dengan jumlah tertentu dan dalam keadaan sempurna mungkin. Penimbangan disini merupakan penimbangan hasil reaksi setelah zat yang dianalisis direaksikan. Hasil reaksi dapat berupa sisa bahan atau suatu gas yang terjadi atau suatu endapan yang dibentuk dari bahan yang dianalisis (Ikhwansyah, 2011).

Kandungan oli bekas sebelum dan setelah mengalami proses degradasi oleh oli bekas kendaraan bermotor diuji dengan metode gravimetri. Mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Juliani *et al.*, (2011) metode analisis gravimetri ini bertujuan untuk mengurai kandungan oli bekas kendaraan bermotor. Berdasarkan pada berat oli bekas kendaraan bermotor yang didapatkan melalui proses ekstraksi dengan larutan n heksan. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara mengambil oli sebanyak 10% oli dalam n heksan. Oli dilarutkan dengan n heksan kemudian disaring menggunakan kertas saring. Larutan n heksan diuapkan di dalam waterbath dengan suhu 50°C hingga terbentuk sebuah pasta minyak. Setelah itu hasil pasta yang didapatkan ditimbang untuk menentukan biomassa polutan.

Berikut adalah rumus perhitungan persentase biomassa oli bekas kendaraan bermotor:

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

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

1.5.9 Analisis GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*)

Komposisi kandungan oli bekas kendaraan bermotor sebelum dan setelah didegradasi yang digunakan di dalam penelitian ini diuji menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*). GC-MS merupakan instrumen analisis hasil kombinasi antara kromatografi gas dan spektrometri massa,

Fitri Widiyanti, 2020

PERANAN KONSORSIUM BAKTERI SEBAGAI REMEDIATOR DALAM PROSES DEGRADASI LIMBAH OLI BEKAS KENDARAAN BERMOTOR

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

kromatografi gas memiliki kemampuan yang sangat baik dalam hal pemisahan dan analisis kuantitatif komponen sedangkan spektrometri massa memiliki kemampuan yang tinggi dalam hal identifikasi atau analisis kualitatif. Lebih dari 20 tahun GCMS telah diperkenalkan untuk analisis sehingga alat ini semakin populer digunakan dalam analisis di bidang kimia, ilmu kedokteran, farmasi, dan lingkungan. Di bidang lingkungan (Harvey, 2000).

Kromatografi didasarkan pada perbedaan kepolaran dan massa molekul sampel yang dapat diuapkan. Sampel yang berupa cairan atau gas dapat langsung diinjeksikan ke dalam injektor, jika sampel dalam bentuk padatan maka harus dilarutkan pada pelarut yang dapat diuapkan. Aliran gas yang mengalir akan membawa sampel yang teruapkan untuk masuk ke dalam kolom. Komponen-komponen yang ada pada sampel akan dipisahkan berdasarkan partisi diantara fase gerak (gas pembawa) dan fase diam (kolom). Hasilnya adalah berupa molekul gas yang kemudian akan diionisasikan pada spektrometer massa sehingga molekul gas itu akan mengalami fragmentasi yang berupa ion positif. Ion akan memiliki rasio yang spesifik antara massa dan muatannya (m/z) (Karliawan, 2009). Sampel yang dianalisis adalah oli bekas kendaraan bermotor murni serta oli bekas yang telah didegradasi selama 15 hari oleh konsorsium bakteri. Oli yang telah diuapkan dan membentuk pasta minyak sebanyak 1ml dimasukkan ke dalam botol vial lalu dilarutkan dengan 4ml n heksan. Sampel dianalisis menggunakan alat GCMS.

1.6 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis dari pertumbuhan konsorsium bakteri dilihat dari perubahan jumlah konsorsium bakteri, persentase kadar limbah oli bekas hasil biodegradasi konsorsium bakteri dan perubahan komposisi senyawa hidrokarbon yang terdapat pada limbah oli bekas kendaraan bermotor sebelum dan setelah didegradasi oleh konsorsium bakteri.

1.7 Alur Penelitian

Alur penelitian pada peranan konsorsium bakteri sebagai remediator

Fitri Widiyanti, 2020

PERANAN KONSORSIUM BAKTERI SEBAGAI REMEDIATOR DALAM PROSES DEGRADASI LIMBAH OLI BEKAS KENDARAAN BERMOTOR

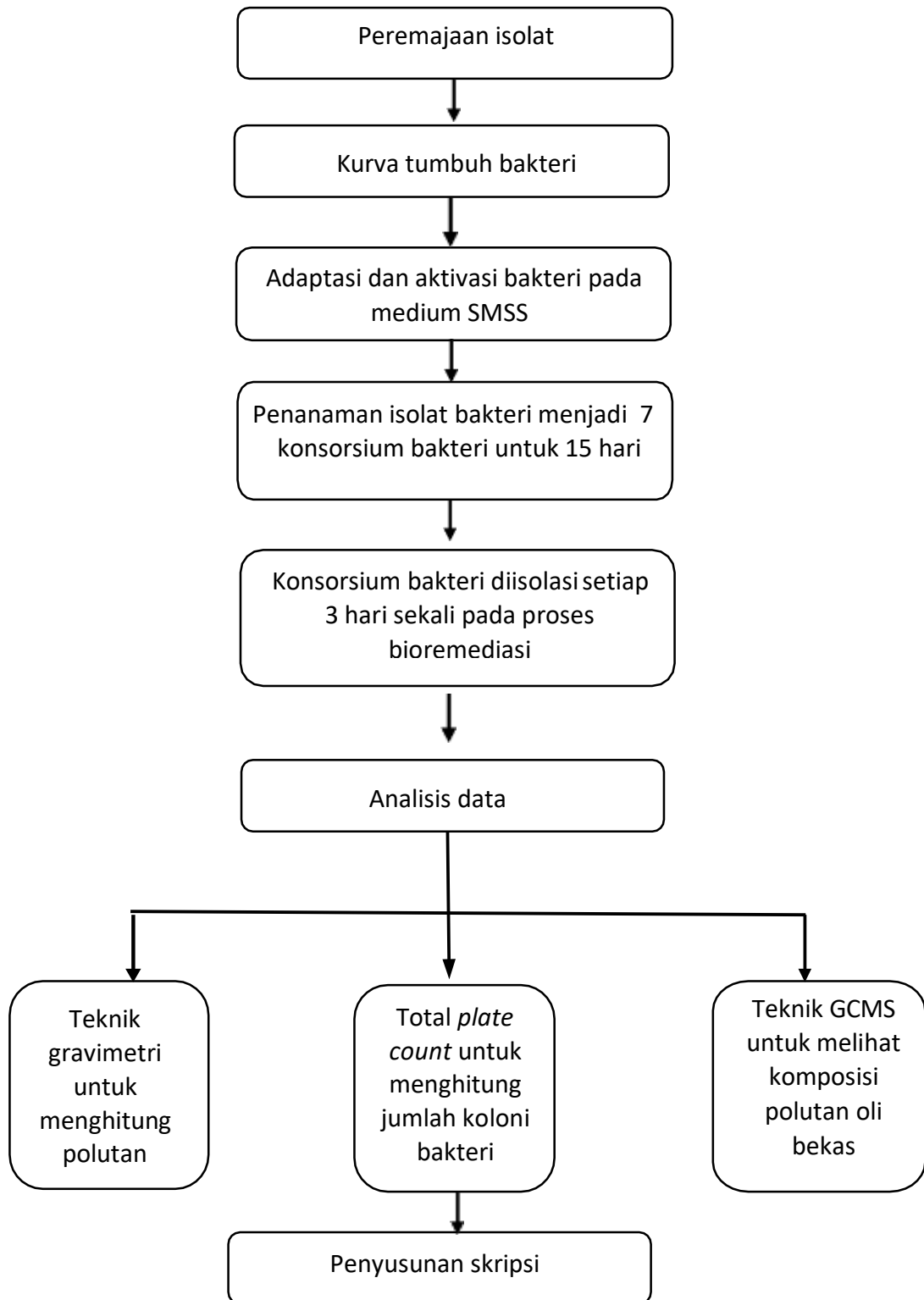
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dalam proses degradasi oli bekas kendaraan bermotor terdapat pada Gambar 3.1.

Fitri Widiyanti, 2020

*PERANAN KONSORSIUM BAKTERI SEBAGAI REMEDIATOR DALAM PROSES
DEGRADASI LIMBAH OLI BEKAS KENDARAAN BERMOTOR*

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



Gambar 3.1 Alur Penelitian