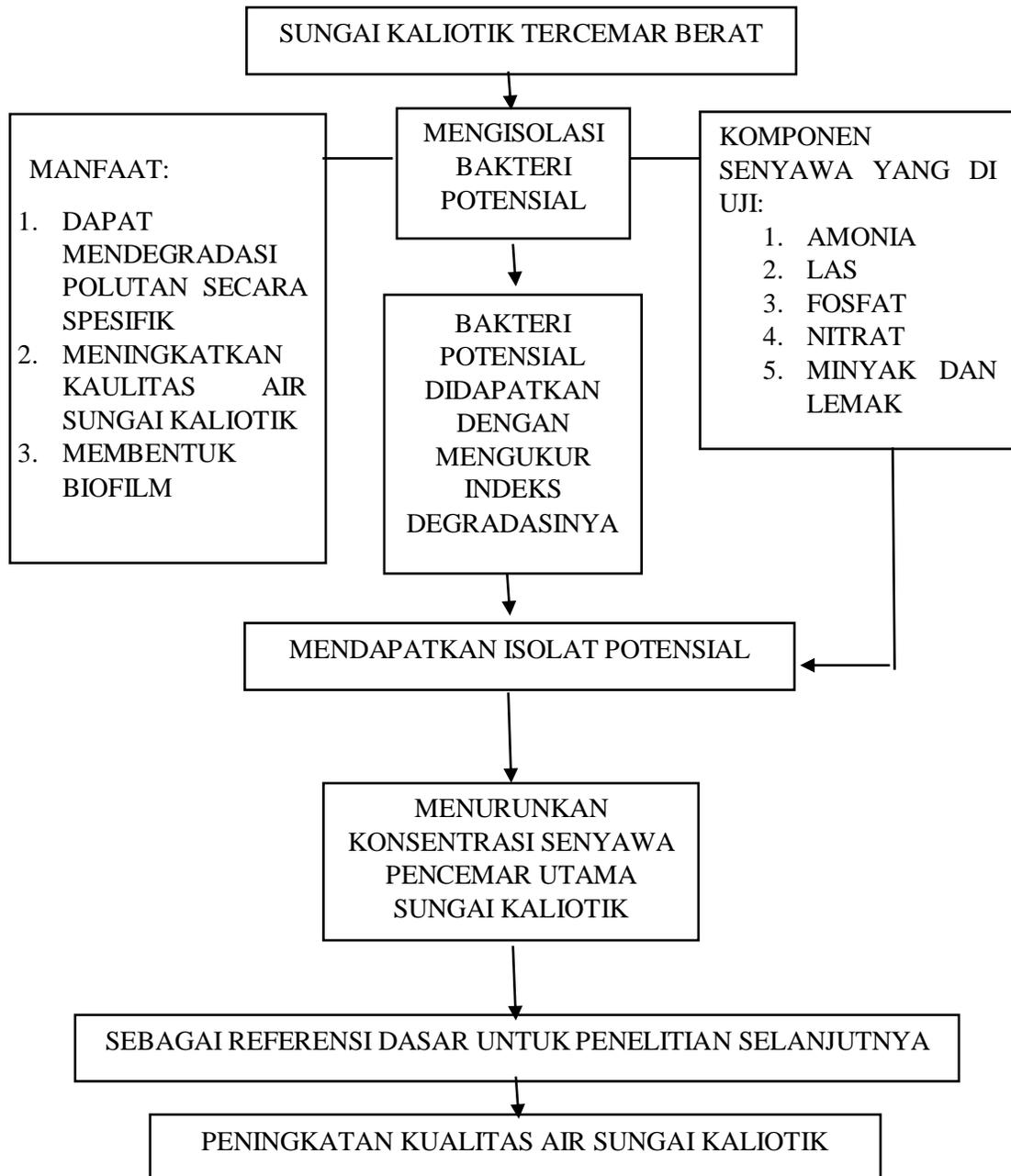


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Berikut merupakan kerangka konseptual yang digunakan dalam penelitian.



Gambar 3. 1 Kerangka Penelitian

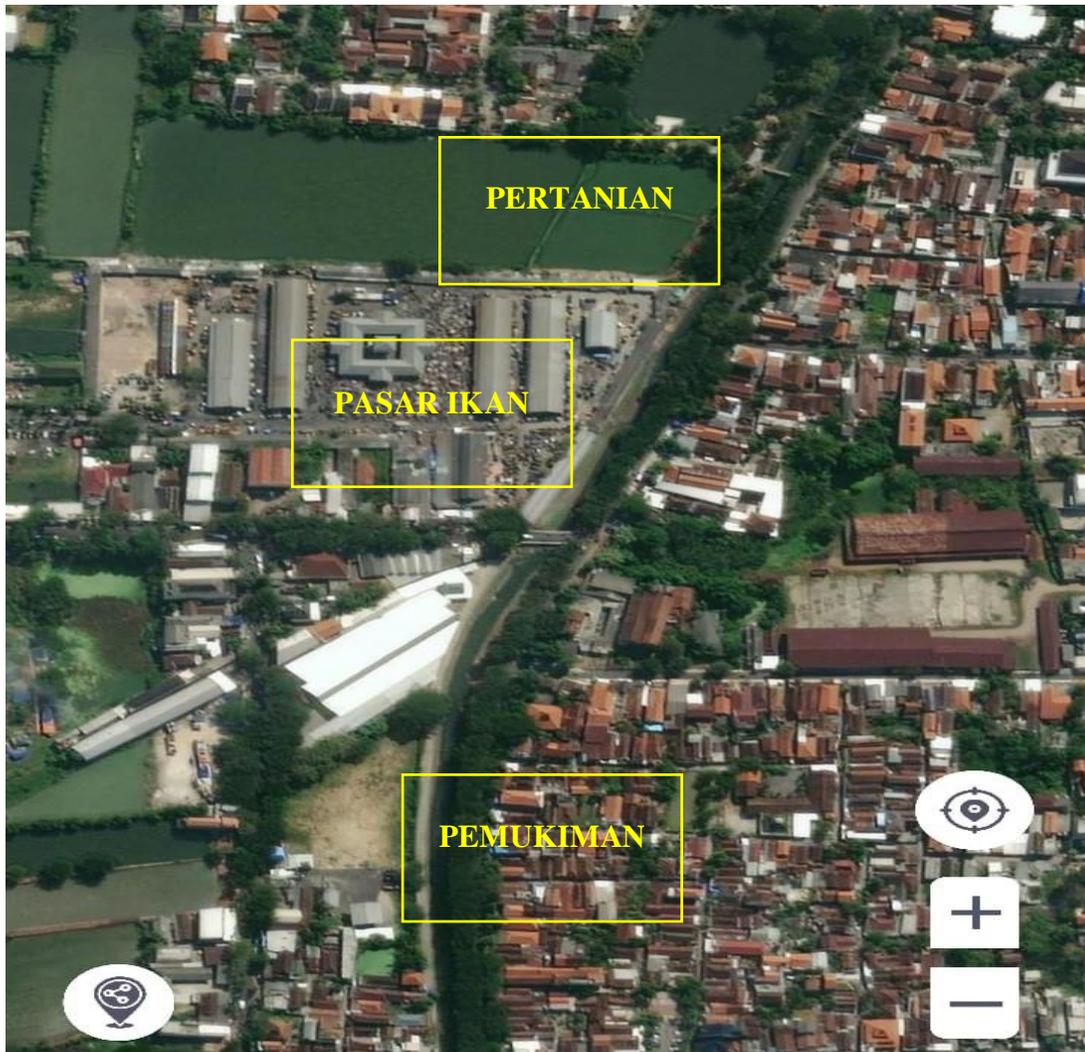
Berdasarkan kerangka konseptual penelitian yang telah digambarkan bahwa Sungai Kaliotik merupakan objek dari penelitian yang terindikasi tercemar berat. Dilakukan pengisolasian bakteri dari air Sungai Kaliotik yang memiliki manfaat yaitu dapat mendegradasi senyawa polutan secara spesifik, meningkatkan kualitas air Sungai Kaliotik dan dapat membentuk biofilm. Komponen senyawa pencemar utama Sungai Kaliotik yang diuji adalah amonia, LAS, fosfat, nitrat serta minyak dan lemak. Bakteri potensial yang didapatkan dari isolasi bakteri akan diukur Indeks Degradasinya (ID) untuk mendapatkan isolat yang benar-benar potensial. Hasil dari penelitian ini digunakan sebagai referensi dasar untuk penelitian selanjutnya serta untuk peningkatan kualitas air Sungai Kaliotik.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan pada sungai Kaliotik berada pada tiga titik yakni kawasan pemukiman terletak di Jl. Laras Liris, kawasan pasar ikan yang berada di Jl. Kusuma Bangsa, Tumenggungan dan kawasan pertanian di Jl. Laras Liris.

Tabel 3.2 Waktu Penelitian

No	Kegiatan	Bulan									
		Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	
1	Studi literatur	■									
2	Penentuan lokasi penelitian										
3	Penyusunan dan uji proposal		■								
4	Perizinan penelitian			■							
5	Penelitian				■	■					
6	Pengumpulan data					■	■	■			
7	Penyusunan laporan skripsi							■	■	■	■



Gambar 3.2 Lokasi Penelitian

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perbedaan titik sampling, air Sungai Kaliotik.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian yang dilakukan ini adalah senyawa pencemar utama (mg/L), jenis bakteri potensial (ml atau gr) dan persentase degradasi (%).

3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah teknik pengambilan sampel, penapisan bakteri, konsentrasi senyawa pencemar utama.

3.3.4 Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah musim dan debit air.

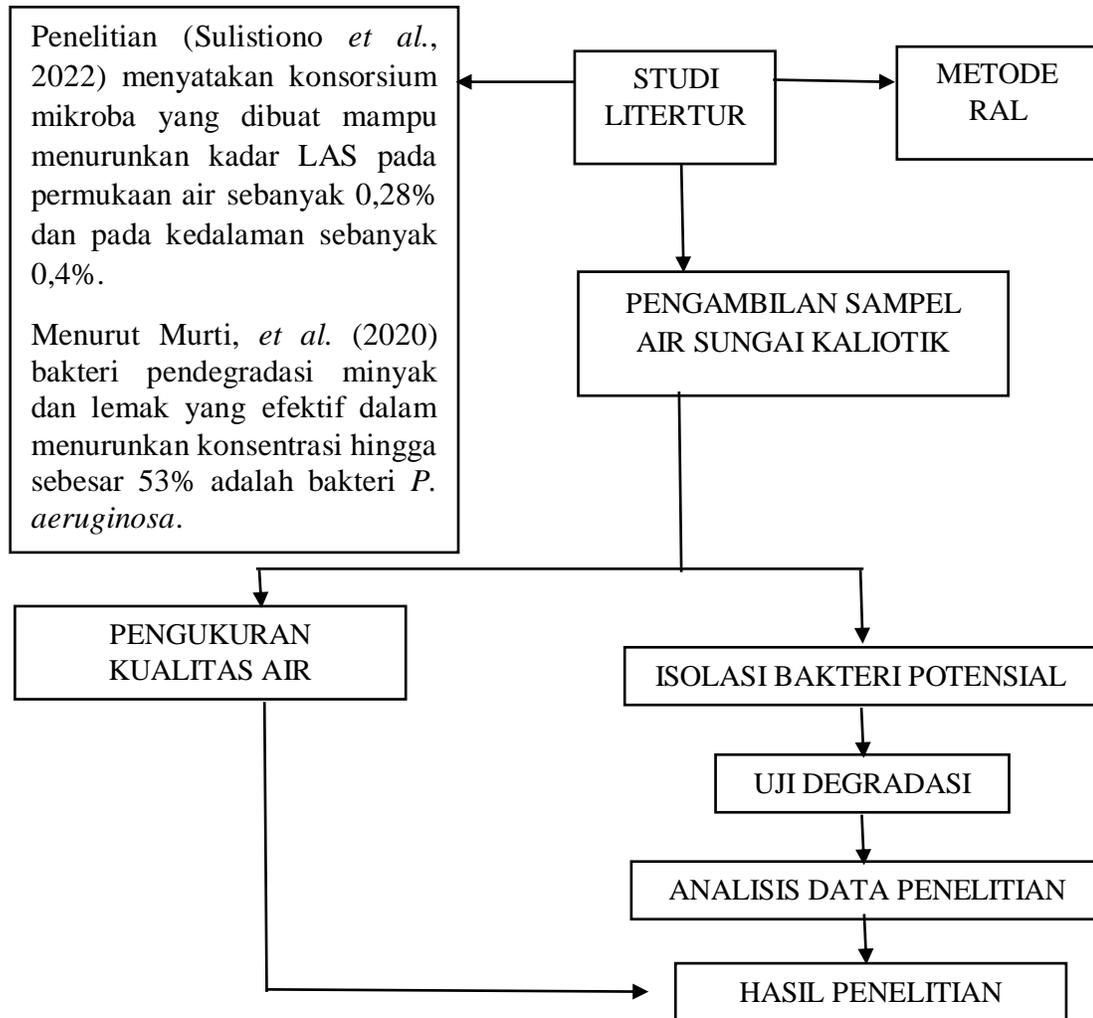
Berikut definisi operasional yang akan disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 3. 3 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat	Hasil	Skala
1	Perbedaan titik Sampling	Pengambilannya berdasarkan Standart Nasional Indonesia (SNI) Tahun 2008 Bagian 57	<i>Stratified Random Sampling</i>	Kertas, bulpoint	Kualitas air Sungai Kaliotik	Nominal
2	Air Sungai Kaliotik	Air hasil dari aktifitas masyarakat	PP No. 22 Tahun 2021	Uji Laboratorium	Kualitas air bersih	Nominal dan Interval
3	Senyawa pencemar utama	Senyawa yang terkandung pada air Sungai Kaliotik	Pengukuran dengan alat	pH meter, termometer, Kolori meter, TDS meter, BOD, COD, DO meter, alat uji MPN	Senyawa pencemar utama	Ordinal
4	Persentase degradasi	Penurunan degradasi senyawa pencemar utama yang diuji dengan menggunakan isolat bakteri potensial	Selisih nilai senyawa pencemar sebelum dan sesudah inkubasi bakteri potensial	Shaker	Menurunkan konsentrasi senyawa pencemar utama	Nominal

3.5 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

Berikut merupakan bagan dari teknik dan instrumen pengumpulan data untuk penelitian yang dilakukan.

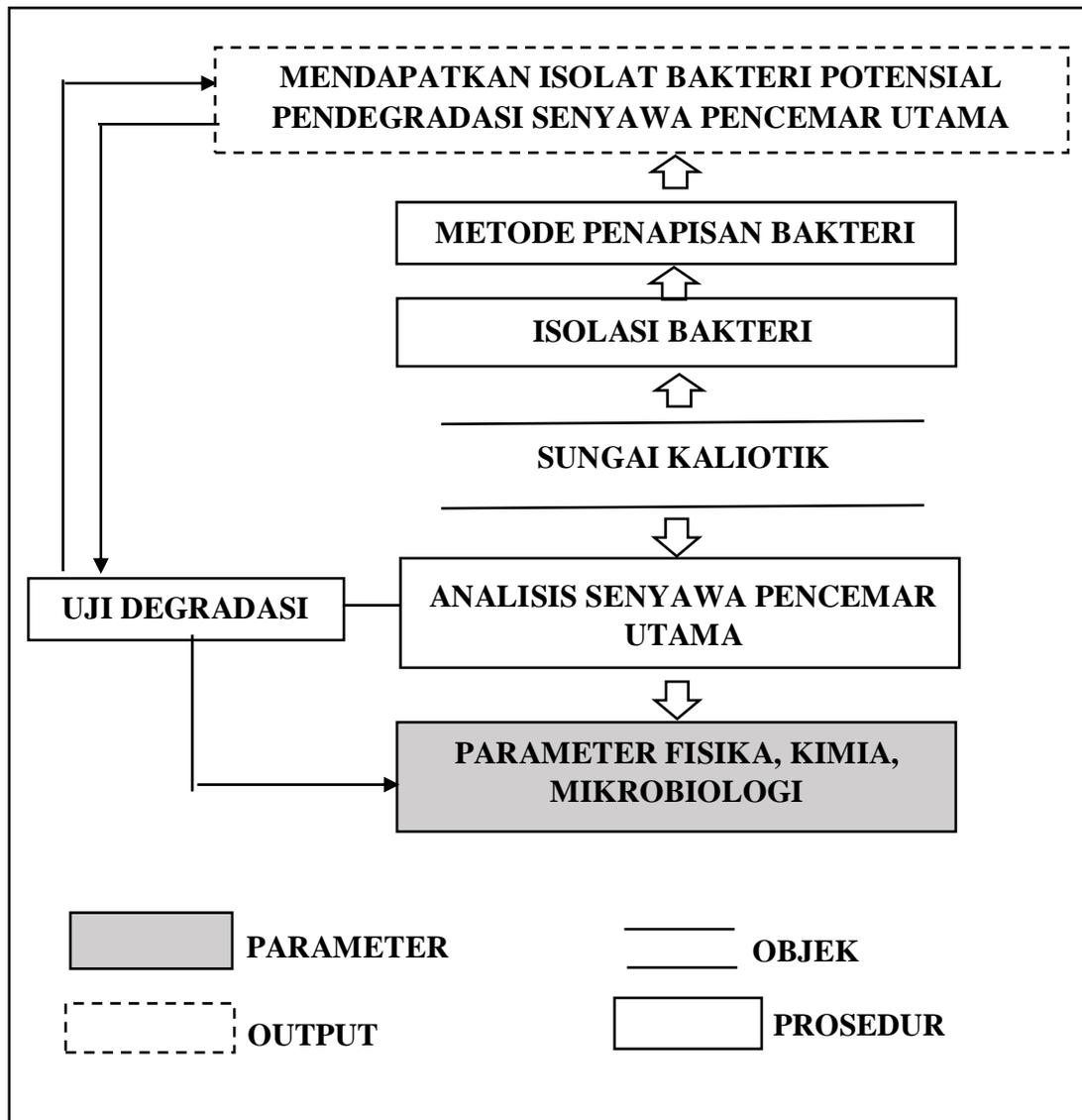


Gambar 3. 3 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan berupa data primer, dimana data tersebut diperoleh dari hasil identifikasi bakteri potensial pada Sungai Kaliotik. Metode yang digunakan adalah eksperimen laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara non faktorial, jenis penelitian yang digunakan ialah penelitian kuantitatif.

3.6 Prosedur Penelitian

Berikut merupakan prosedur dari penelitian yang akan dilakukan.



Gambar 3. 4 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan sampel

Wilayah tersebut merupakan tempat mengalirnya air sisa dari kegiatan masyarakat di sekitar Sungai Kaliotik baik dari kegiatan rumah tangga,

berdagang dan pertanian. Pengambilan sampel dilakukan dengan memperhatikan kondisi cuaca, apabila terjadi hujan maka pengambilan sampel dilakukan 3 hari setelah turunnya hujan. Debit air harus diperhatikan, karena jika debit airnya rendah maka pengambilan akan lebih mudah dan sedimen bisa ikut terambil.

Pengambilan sampel dilakukan dengan memodifikasi teknik pengambilan sampel dari penelitian yang dilakukan oleh (Wati, *et al.*, 2022), pengambilan sampel dilakukan dengan mengacu pada Standart Nasional Indonesia (SNI) Tahun 2008 Bagian 57 Tentang Metoda pengambilan air permukaan, titik pengambilan sampel air sungai berdasarkan debit air untuk sungai dengan debit kurang dari 5 m³/detik maka pengambilannya pada titik tengah sungai dengan kedalaman 0,5 kali kedalaman dari permukaan.

Pengambilan sampel menggunakan metode komposit sampling, yakni dari tiga stasiun disetiap satu stasiun terdiri dari tiga titik yang masing-masing berjarak 2,5 m kemudian dihomogenkan dan dimasukkan kedalam wadah yang telah disterilisasi. Sejalan dengan (kesi, *et al.*, 2016) sampel air sungai Kaliotik pengambilannya dilakukan secara aseptik menggunakan sebuah botol yang sudah disterilkan dan penyimpanannya di dalam *cooling box*. Pengambilannya dari beberapa titik tertentu dengan volume dan waktu yang sama secara horizontal masing-masing sebanyak 1 liter. Pengambilan sampel dengan melakukan pembilasan alat menggunakan air sampel (air sungai) sebanyak tiga kali. Sejalan dengan Ahdiaty (2020) bahwa alat pengambilan sampel harus dibilas dengan air sampel sebanyak tiga kali.

Sampel air yang digunakan untuk isolasi strain-strain bakteri diambil dari sedimen sungai yang airnya menggenang (*pool*) dan bagian yang airnya mengalir cepat (*current*) (Suriani, 2015).

3.6.2 Penentuan Status Kimia Pencemar Utama Sungai Kaliotik

Sungai Kaliotik merupakan sungai dengan status tercemar berat, hal ini sesuai dengan yang disampaikan pada penelitian Shaleh, *et al.*, (2021) bahwa pada bulan Maret – September 2020 dilakukan pengamatan yang hasilnya terdapat parameter-parameter yang melebihi ambang baku mutu air.

Baku mutu air sungai yang digunakan adalah Peraturan Pemerintah tentang Penyelenggaraan Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup Nomor 22 Tahun 2021.

Tabel 3. 6. 2 Standar Baku Mutu yang Digunakan

No	Parameter	Unit	Standar Baku Mutu PP RI Nomor 22 Tahun 2021 (Kelas 3)
Parameter Fisika			
1	Temperatur	°C	Dev 3
2	<i>Total Dissolved Oxygen</i> (TDS)	mg/L	1.000
3	<i>Total Suspended Solid</i> (TSS)	mg/L	100
Parameter Kimia			
1	pH		6 – 9
2	<i>Biological Oxygen Demand</i> (BOD)	mg/L	6
3	<i>Chemical Oxygen Demand</i> (COD)	mg/L	40
4	<i>Dissolved Oxygen</i> (DO)	mg/L	3
5	Nitrat	mg/L	20
6	Amonia	mg/L	0,5

Lanjutan Tabel 3.6.2

7	Minyak dan Lemak	mg/L	1
8	Deterjen Total	mg/L	0,2
9	Total Fosfat	mg/L	1,0
Parameter Mikrobiologi			
1	<i>Total Coliform</i>	MPN/ 100 ml	10.000

3.6.3 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri diambil dari tiga stasiun dimana masing-masing stasiun pengambilan sampel dilakukan pada sub titik yang kemudian dihomogenkan. Menurut penelitian Huda, 2012 sebelum dilakukan isolasi dilakukan pengenceran sampai 10^7 kemudian diambil sebanyak 1 ml diinokulasikan pada media NA 5 % menggunakan metode *streak plate*. Biakan bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Pemurnian isolat dilakukan dengan mengamati koloni yang terbentuk secara terpisah dan berbeda diinokulasikan kembali pada media NA 5 % dengan menggunakan metode *streak plate* sampai bakteri yang tumbuh sejenis.

3.6.3.1 Pewarnaan Gram

Dengan mengambil sebanyak 1 ose biakan bakteri untuk ditempelkan pada kaca objek. Tetesi pewarna yang pertama kristal violet pada biakan bakteri dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Pewarna yang kedua yaitu lugol dibiarkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir. Ketiga di tetesi dengan alkohol 96% dibiarkan selama 10-20 detik

lalu dicuci dengan air yang mengalir. Terakhir dengan tetesan safranin dibiarkan selama 1 menit dan dicuci dengan air yang mengalir.

Dikeringkan dengan kertas tisu disekitar bakteri pada kaca objek lalu ditambahkan minyak emersi dan ditutup dengan kaca kecil lalu diamati pada mikroskop. Apabila bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut dengan gram negatif, namun jika berwarna ungu sedikit pink maka bakteri tersebut bergram positif (Fitri dan Yasmin, 2014).

3.6.3.2 Penapisan Bakteri

Penapisan bakteri dimodifikasi dari penelitian Bestari (2015), dilakukan pembiakan bakteri sebanyak satu ose dengan lama waktu inkubasi 24 jam dengan suhu 37⁰C pada media cair sebanyak 5 ml yang memiliki komposisi NaCl sebanyak 1gr/100ml, Tween-80 1ml/100ml, pepton 2gr/100ml , dan minyak kelapa sawit steril 2ml/100ml. Selanjutnya kertas cakram yang memiliki diameter ±5 mm dicelupkan ke dalam media cair selama 10-15 menit. Kertas cakram tersebut diletakkan tepat diatas media padat yang telah dipadatkan di dalam cawan petri yang memiliki komposisi NaCl 0,25 gr, pepton 0,5 gr, CaCl.2H₂O 0,1 gr, agar 0,5 gr, Tween-80 0,25 ml, minyak kelapa awit steril sebanyak 0,33 ml dan dengan tambahan pewarna metil merah 0,01 % dan aquades 25 ml. Media padat tersebut diinkubasi selama 7 × 24 jam. Dilakukan perhitungan diameter zona bening pada hari ke tujuh dengan rumus ID (Indeks Degradasi) sebagai berikut:

$$ID = \frac{\text{Diameter Zona Bening (cm)} - \text{Diameter Koloni (cm)}}{\text{Diameter Koloni (cm)}}$$

3.7.4 Uji Degradasi Bakteri Potensial

Uji degradasi bakteri potensial dilakukan dengan menambahkan sebanyak 50 ml suspensi bakteri yang terdiri dari 50 ml aquades dengan 2 cawan bakteri potensial dengan $OD_{\lambda:610\text{mm}}=0,5$ pada air limbah sebanyak 1,5 L. Inkubasi dilakukan pada sebuah toples dengan menambahkan aerator untuk proses aerasi yang dilakukan selama 3 hari, 6 hari dan 9 hari. Uji degradasi menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara non faktorial. Sejalan dengan Nurisman (2020) bahwa uji degradasi air limbah sebanyak 500 ml yang mengandung amonia dengan menambahkan suspensi bakteri sebanyak 2,5 % selama 8 hari yang disertai proses aerasi.

Tabel 3. 7. 1 Uji Degradasi Bakteri Potensial Menggunakan Rancangan Acak Lengkap

Hari	Senyawa yang didegradasi (D_x)
H_0	$H_0 D_x$
H_3	$H_3 D_x$
H_6	$H_6 D_x$
H_9	$H_9 D_x$

Keterangan:

D_x : Degradasi Senyawa X

Senyawa X akan diketahui setelah proses penapisan bakteri.