

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi yang di pilih sebagai titik pengambilan sampel berbentuk titik merah pada gambar 3.1 di bawah ini:



Gambar 3.1 Lokasi Pengambilan Sampel di Pabrik Silika Kawasan PIER Kabupaten Pasuruan.

Keterangan :



: Kawasan PIER



: Pabrik Silika Kawasan PIER

Lokasi penelitian ini dilakukan pada pabrik silika yang berada pada Kawasan PIER Kabupaten Pasuruan, penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari tahun 2023.

Tabel 3.1 Waktu Kegiatan.

No	Kegiatan	Bulan											
		Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni	Jul	Agst	
1.	Studi Literatur	■											
2.	Penentuan Lokasi Penelitian	■	■	■									
3.	Penyusunan dan uji proposal				■								
4.	Perizinan penelitian					■							
5.	Pengumpulan data					■							
6.	Penyusunan laporan skripsi						■						
7.	Seminar Hasil												■
8.	Sidang Akhir												■

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah isolat bakteri potensial.

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian yang sedang dilakukan ini adalah kandungan timbal (Pb) Mg/L.

3.2.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah teknik pengambilan sampel, penapisan bakteri dan uji pengaruh isolat bakteri terhadap kandungan timbal (Pb).

3.2.4 Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini adalah cuaca, musim, dan volume/debit air.

3.2.5 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 3.2 Definisi Operasional.

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat	Hasil	Skala
1.	Bakteri potensial	Diidentifikasi dengan melakukan isolasi bakteri di Laboratorium	Uji Laboratorium	Cawan petri, media NA	Bakteri yang mampu mendegradasi timbal (Pb).	Ordinal
2.	Limbah cair (Pb)	Limbah yang berasal dari limbah pabrik silika Kawasan PIER Kabupaten Pasuruan	Pengujian dengan uji laboratorium		Cemaran atau senyawa berbahaya dari limbah cair pabrik silika Kawasan PIER yang akan didegradasi dengan bakteri murni	Interval
3.	Teknik pengambilan sampel	Teknik pengambilan sampel dilaksanakan dengan aseptik atau higienis agar sampel tidak terkontaminasi pencemar dari luar.	Botol kaca steril	Kertas, bulpoin	Kualitas air limbah pabrik silika	Nominal
4.	Uji isolasi bakteri	Dilakukan uji isolasi bakteri yang dapat mendegradasi timbal (Pb).	Uji Laboratorium	Inkubator, cawan petri, Laf, Autoklaf	Bakteri pendegradasi timbal (Pb)	Ordinal

3.3 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

Penelitian ini merupakan jenis penelitian Quasy Experimen. Hasil perlakuan dapat diketahui lebih akurat karena dapat dibandingkan dengan keadaan

sebelum diberi perlakuan (Fitrianingsih & Musdalifah, 2015), meliputi isolasi dan identifikasi bakteri X pada air yang tercemar oleh logam berat Timbal (Pb) di sekitar Kawasan PIER Pasuruan, Jawa Timur.

3.4 Alat dan Bahan

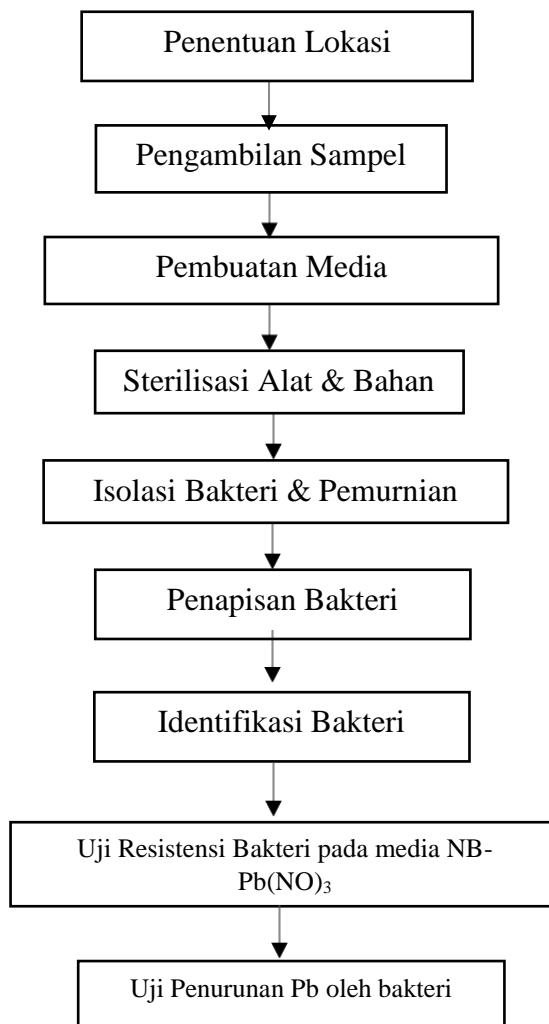
Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung reaksi erlenmeyer, timbangan analytik, cawan petri, bunsen, LAF, inkubator, mikropipet, mikroskop, jarum ose, *pH meter*, *bluetip*, *hotplate*, *strrier*, *beaker glass*, *objek glass*, *cover glass*, *vortex*, botol kaca/toples kaca, bunsen, *grab sampler*, *ice box*, seperangkat alat uji Spektrofotometer Serapan Atom.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah media NA, NB, aquades steril, kapas, alkohol 70%, sampel sedimen dan air limbah pabrik silika, label, plastik tahan panas, *plastik warp*, *tissue*, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, gentian violet, larutan lugol, larutan safranin, minyak emersi, media Glukosa.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur Penelitian Isolasi Bakteri X di Pabrik Silika PIER Kabupaten

Pasuran di uraikan pada gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.2 Prosedur Penelitian.

3.5.1 Pengambilan Sampel



Gambar 3.3 Aliran Pabrik Silika PIER Kabupaten Pasuruan.

Pengambilan sampel air di kawasan PIER Kabupaten Pasuruan dilakukan dengan metode *purposive sampling* sebanyak 1 titik pada area pipa pembuangan limbah ke aliran tersebut, dimana teknik pengambilan sampel mempunyai pertimbangan tertentu yang dilakukan oleh peneliti (Agustini & Winarni, 2014). Pemilihan titik berdasar kan adanya arus aliran limbah. Sampel air diambil dengan menggunakan botol kaca steril pada permukaan air sungai. Selanjutnya sampel air disimpan didalam *ice box* dan dibawa ke laboratorium untuk diidentifikasi.

3.5.2 Pembuatan Media

Media NA ditimbang sebanyak 4 gram, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan *aquades* sebanyak 200 ml, kemudian erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan *aluminium foil*. Media kemudian dipanaskan di atas *hot plate*, hingga media homogen. Selanjutnya media NA disterilkan menggunakan

autoklaf pada suhu 121⁰C. Setelah disterilkan dengan autoklaf media NA ditambahkan logam Pb(NO)₃ dengan konsentrasi 10 ppm kemudian dituangkan ke dalam cawan petri lalu ditunggu hingga memadat.

3.5.3 Sterilisasi Alat dan Media

Peralatan yang berbahan kaca sebelumnya dibungkus dengan kertas bekas dan ditempatkan dalam plastik tahan panas. Media disterilkan dengan media NA dan media yang digunakan untuk uji biokimia antara lain: *Glukosa*, *Laktosa*, *Sukrosa*, *Maltosa*, *Mannitol*, *Methyl Red (MR)*, *Voges Proskauer (VP)*, *MIO*, *Urease Base*, juga seperti tabung reaksi dan ujung biru . Media yang digunakan untuk penelitian dihomogenisasi di atas hot plate kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dan tekanan 1 atm.

3.5.4 Isolasi Bakteri dan Pemurnian Bakteri

Sampel sedimen ditimbang sebanyak 5 gr dan diencerkan dengan aquades steril sebanyak 10 ml, dihomogenkan menggunakan *vortex* sehingga didapatkan pengenceran 10⁻¹. Selanjutnya sampel diambil 1 ml dari pengenceran 10⁻¹ ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisikan 9 ml aquades steril sehingga didapatkan pengenceran 10⁻², diambil 1 ml dari pengenceran 10⁻² ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril sehingga didapatkan pengenceran 10⁻³. Pengenceran pada tahapan ini dilakukan secara bertingkat yaitu 10⁻¹ sampai 10⁻⁴. Pengenceran 10⁻¹ sampai pengenceran 10⁻⁴ diinokulasikan pada media NA yang telah ditambahkan larutan Pb(NO)₃ 10 ppm dengan *metode spread plate*, lalu diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam, kemudian diamati koloni yang tumbuh (Junopia, 2015). Koloni tunggal yang sudah tumbuh kemudian dimurnikan kembali menggunakan metode *streak plate*. Isolat

bakteri diambil secara aseptis dengan jarum ose yang sebelumnya sudah di lalu lintaskan pada api bunsen, kemudian diinokulasikan ke permukaan media NA yang mengandung $Pb(NO)_3$ 10 ppm, kemudian diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam (Rohma, 2017).

3.5.5 Identifikasi Bakteri

1. Pengamatan Makroskopik

Pengamatan makroskopik dilakukan untuk mengamati karakteristik koloni bakteri hasil inokulasi pada media NA datar:

- a.** Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa bulat (*circulair*), tak teratur (*irregular*).
- b.** Permukaan koloni/ elevasi (dilihat dari samping) rata, timbul-datar, timbul melengkung, tidak beraturan
- c.** Tepi koloni (dilihat dari atas) utuh, berombak, bergerigi, keriting.
- d.** Warna koloni: kekuning-kuningan, agak sedikit putih.

2. Identifikasi Bakteri secara Makroskopik

Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk melihat bentuk sel dan ciri-ciri bakteri. Pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan Gram dan pengujian biokimia.

a. Pewarnaan Gram

Salah satu teknik pewarnaan diferensial yang paling penting ialah pewarnaan gram. Dalam proses ini olesan bakteri yang terfiksasi dikenai larutan-larutan diantaranya : Ungu kristal, Larutan yodium, Alkohol, Safranin.

b. Uji Biokimia

Uji biokimia pada bakteri adalah suatu metode atau proses yang digunakan untuk mengidentifikasi kultur murni bakteri yang diisolasi melalui karakteristik

fisiologi. Dalam uji biokimia, karakteristik metabolisme bakteri biasanya diamati melalui interaksi antara metabolit yang dihasilkan dengan bahan kimia reagen. Percobaan lain bisa dilakukan dengan mengamati kemampuan menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan energi. Uji-uji biokimia dilakukan untuk memverifikasi bahwa bakteri yang sedang dianalisis adalah bakteri yang diinginkan. Uji biokimia dilakukan untuk mengurangi kesalahan, karena beberapa jenis memiliki karakteristik yang hampir serupa (MacFaddin, 1980).

Beberapa jenis uji biokimia antara lain:

1. Uji Katalase

Uji katalase berguna untuk menentukan apakah bakteri dapat menghasilkan enzim katalase atau tidak, jika uji katalase memberikan hasil positif, itu akan ditunjukkan oleh munculnya gelembung udara setelah bakteri dijatuhkan ke dalam larutan H_2O_2 . Namun, jika hasil uji katalase negatif, maka tidak akan terbentuk gelembung udara. Menurut tabel 4.3, terlihat bahwa ada gelembung udara pada bakteri setelah ditetaskan larutan H_2O_2 , sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua isolat tersebut mengandung enzim katalase atau memberikan hasil yang positif untuk enzim katalase.

2. Uji TSIA (*Tripel Sugar Iron*)

Uji TSIA dilakukan dengan melarutkan media TSIA ke dalam aquades steril dan mengukur pH hingga mencapai netral, yaitu 7.4. Setelah media tersebut disterilisasi, media tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi secara vertikal. Setelah media tersebut mengeras, media tersebut ditusuk dengan 1 ose bakteri dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kedua isolat berdasarkan tabel 4.4.

mengalami perubahan warna yang berarti medium miring berwarna merah sementara medium yang tegak berwarna kuning dan terdapat udara dan endapan hitam yang berarti kedua isolat hanya mengalami fermentasi glukosa saja, dan menghasilkan gas dan H₂S.

3. Uji SIM (*Sulfid Indol Motility*)

Uji SIM dengan menggunakan media SIM yang telah di sterilkan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml media SIM, lalu diambil 1 ose bakteri ditusuk kedalam media dan diinkubasi dalam oven selama 24jam. Berdasarkan tabel 4.5 setelah media diinkubasi selama 24jam terlihat pada Isolat A tidak menghasilkan H₂S karena media tidak berwarna hitam namun mengandung indol negatif karena setelah media ditetesi Erlic sebanyak 3-5 tetes dan didiamkan tetap tidak terdapat cincin merah di permukaan media jadi Isolat A tidak mengandung indol, tetapi terjadi kekaburan media di tempat tusukkan ose yang berarti terdapat motilitas, dan pada Isolat B mengandung H₂S karena media berubah warna menjadi hitam, indol tidak terkandung karena setelah ditetesi pun tidak terbentuk cincin merah, tetapi terdapat motilitas karena ada kekaburan di tempat tusukan media.

4. Uji SC (*Simmons Citrate*)

Uji SC (*Simmons Citrate*) digunakan untuk mengetahui sumber karbon menggunakan sitrat atau tidak menggunakan sitrat. Menggunakan media SC yang dipadatkan dan bakteri diambil menggunakan ose lalu diusapkan di atas permukaan media yang memadat diinkubasi selama 24 jam dalam oven. Berdasarkan tabel 4.6 setelah media diinkubasi selama 24 jam mengalami perubahan warna yaitu kedua isolat A maupun B berubah dari awalnya berwarna

hijau menjadi berwarna biru setelah diinkubasi yang berarti bakteri tersebut mampu memanaatkan sitrat sebagai sumber karbonnya.

3.5.6 Pengukuran Kadar Pb dengan AAS

Dilakukan pengambilan isolat 0, 15, 30, 45 ppm dan diambil sebanyak batas kuvet yang sudah di tentukan, lalu dimasukan kedalam Spetrofotometer dan akan keluar hasilnya setelah alat di tutup.

3.5.7 Pengukuran Efisiensi Penurunan Kadar Pb oleh Bakteri

Menyatakan bahwa perhitungan konsentrasi logam Pb terserap atau menggunakan metode Langmuir dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$C_s = C_a - C_b$$

Perhitungan % Penurunan Kadar Logam Penentuan presentase logam berat sesuai dengan persamaan :

$$D = \frac{C(a) - C(b)}{C(a)} \times 100\%$$

Keterangan: D = Daya penurunan kadar Pb

$$C_s = \text{Pb yang kadarnya berkurang (ppm)}$$

$$C(a) = \text{Konsentrasi awal Pb (ppm)}$$

$$C(b) = \text{Konsentrasi Akhir Pb(ppm)}$$

3.6 Analisis Data

Data yang didapatkan meliputi kandungan logam berat Pb pada sampel air dan sedimen pada satu titik, karakteristik makroskopik, mikroskopik dan fisiologis isolat bakteri toleran terhadap logam berat Pb dari pabrik silika KawasanPIER Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur dijelaskan secara deskriptif berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteria 2nd Edition* (Noel et al., 1989),

Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (3rd Ed) (Barrow & R.K.A, 1993). Dan menggunakan uji analisis statistik Anova, Uji Anova adalah bentuk khusus dari analisis statistik yang banyak digunakan dalam penelitian eksperimen. metode analisis ini dikembangkan oleh R.A Fisher (Septiadi & Ramadhani, 2020).

