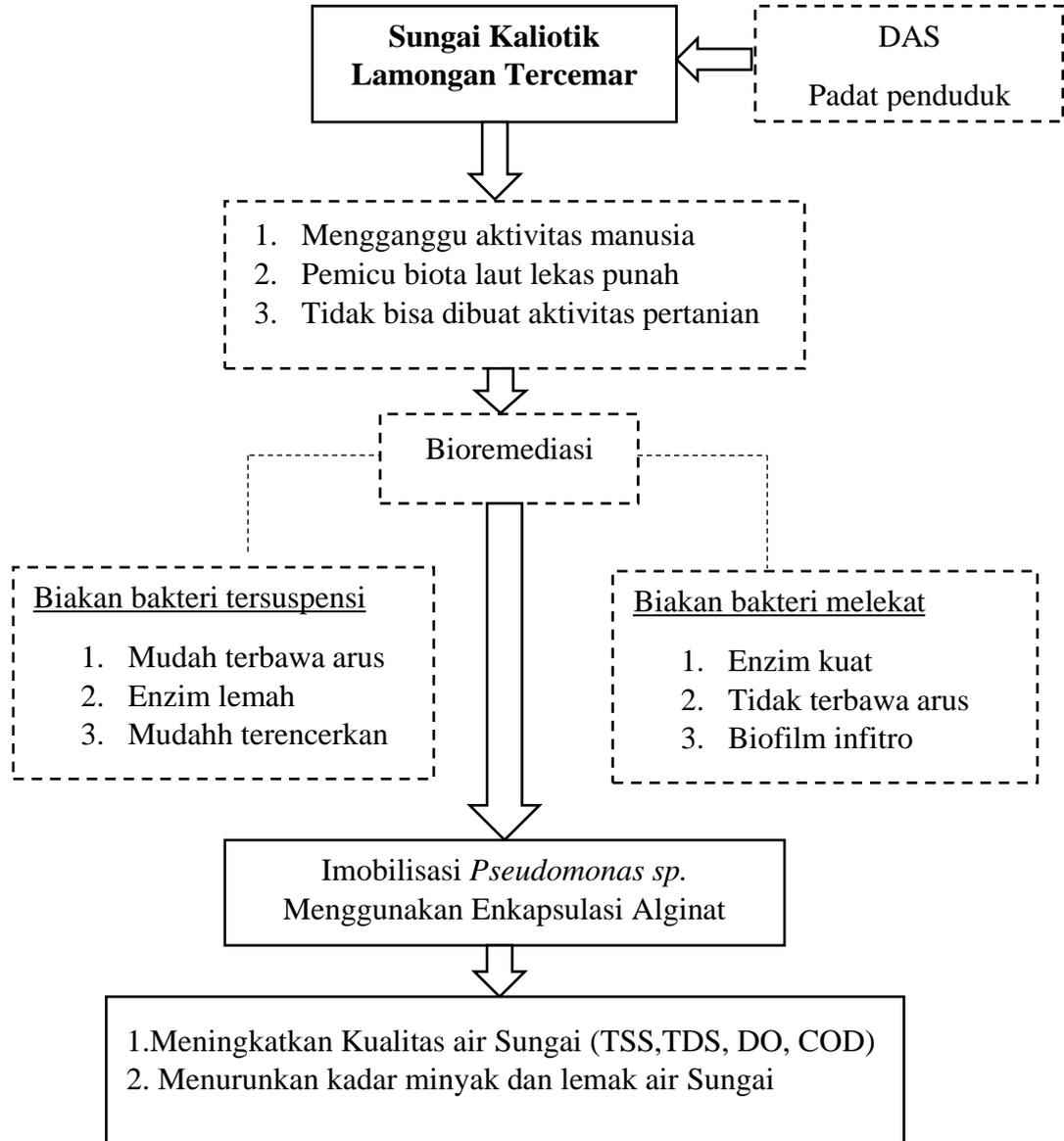


BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Kerangka konseptual penelitian yang akan dilaksanakan ditunjukkan pada Gambar 3.1 sebagai berikut:

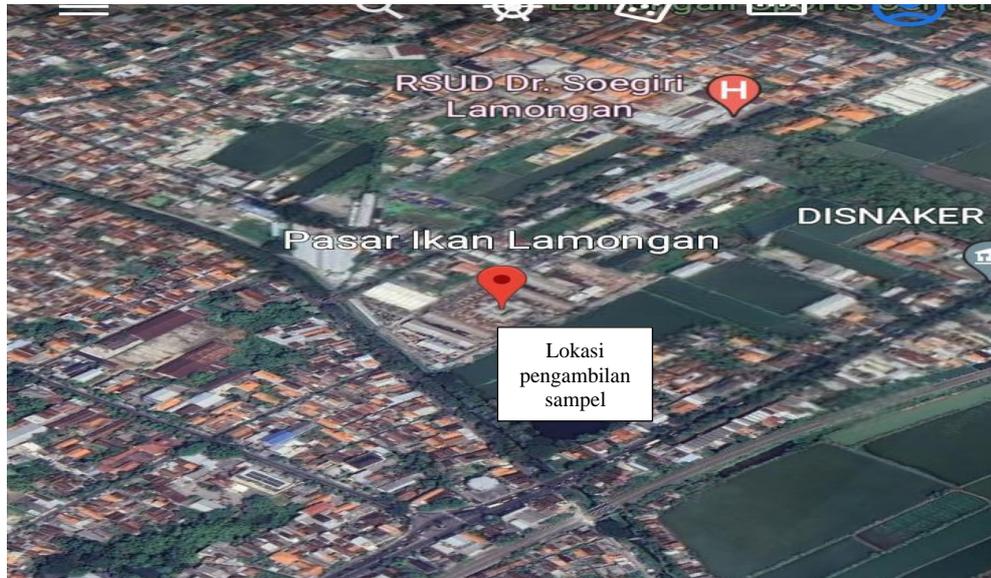


Keterangan:

: Yang Diuji
 : Yang Tidak diuji
 ➡ : Sebab akibat
 - - - - - : Hubungan

Gambar 3. 1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.2 Lokasi Dan Waktu Penelitian



Gambar 3. 2 Denah Lokasi Pengambilan Sampel Air Sungai Kaliotik

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesehatan Lingkungan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Lamongan. Pengambilan sampel air dilakukan langsung di Sungai Kaliotik dengan komposit tiga titik sampling area pasar ikan setelah IPAL (Instalasi Pengelolaan Air Limbah) pada bulan Januari–April 2023. Titik pengambilan sampel air mengacu pada hasil penelitian Wati, *et al.* (2022).

3.3 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini variabel-variabel penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

3.3.1 Variabel bebas (*independent variabel*)

Imobilisasi bakteri potensial.

3.3.2 Variabel Terikat (*dependent variabel*)

Penurunan bahan pencemar air Sungai Kaliotik.

3.3.3 Variabel Kontrol

Bakteri potensial, sterilisasi alat, kontaminasi, dan persentase alginat.

3.3.4 Variabel Pengganggu

Perubahan suhu, pH, cuaca, debit air dan sanitasi laboratorium.

Berikut ini tabel definisi operasional dan variabel penelitian:

Tabel 3. 1 Tabel Definisi Operasional Dan Variabel Penelitian

No.	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat	Hasil	Skala
1.	Imobilisasi Bakteri	proses pemerangkapan sel dalam suatu matrik	Menggunakan enkapsulasi alginat konsentrasi 4%	Uji Laboratorium	Kapsul bakteri yang telah terimobilisasi	Nominal
2.	Penurunan bahan pencemar	Persentase bahan pencemar air	Uji biodegradasi	Uji Laboratorium	Kualitas air baku	Nominal
3.	Bakteri potensial	Mikroorganisme yang berperan penting	Lolos uji skrining pada peneliti sebelumnya	Uji Laboratorium	Bakteri potensial	Ordinal
4.	Sterilisasi alat	Kebersihan alat dan sesuai dengan SOP	SOP alat laboratorium	Uji Laboratorium	Alat yang steril	Interval
5.	Perubahan suhu	Persentase penurunan suhu setelah perlakuan	Uji perubahan suhu	Uji laboratorium	Perubahan suhu	Nominal
6.	Peningkatan Kualitas air sungai	Persentase perubahan kualitas air sungai	PP No.22 Tahun 2021	Uji Laboratorium	Persentase kualitas air sungai	Nominal

3.4 Teknik Dan Instrument Pengumpulan Data

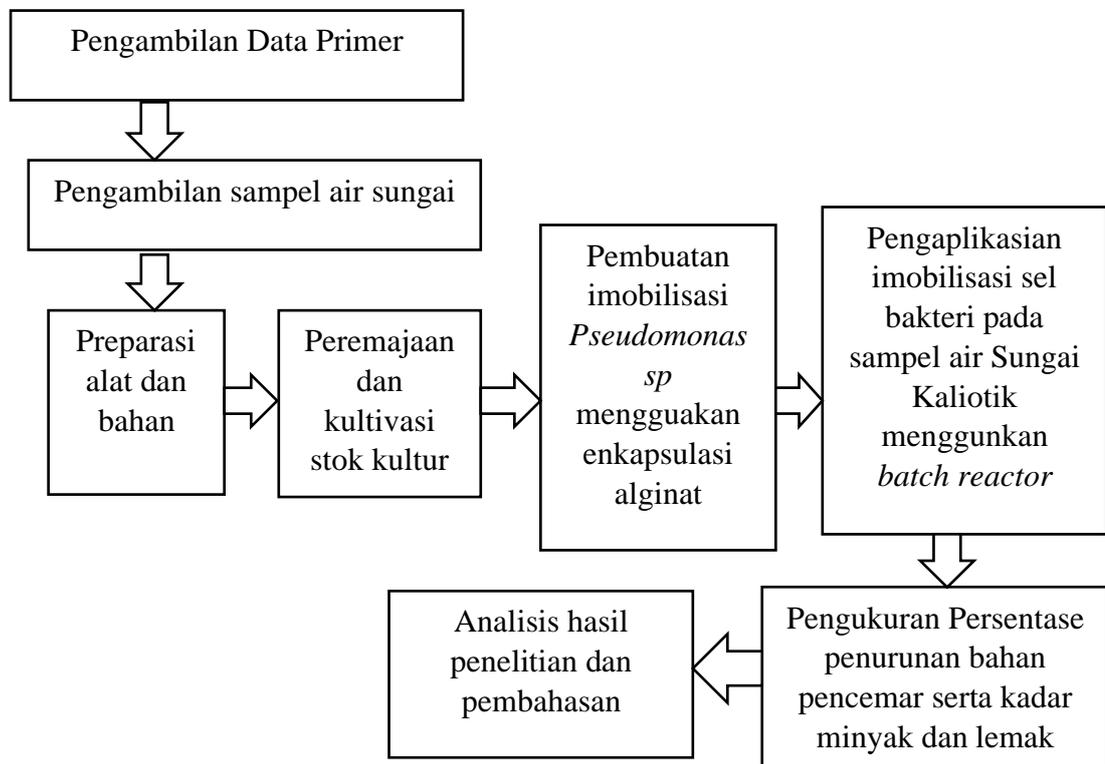
Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini mengambil dari satu data yakni data primer. Data primer adalah data yang diambil secara langsung pada Sungai Kaliotik Kabupaten Lamongan. Teknik dan instrumen pengumpulan data penelitian menggunakan metode dapat dilihat pada tabel 3.2 dibawah ini:

Tabel 3. 2 Tabel Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

No.	Kegiatan	Metode yang digunakan	Intrumen yang digunakan
1.	Pengambilan sampel air sungai	Metode observasi langsung pada lokasi dan metode studi literatur mengacu pada hasil penelitian Wati et al. (2022).	a. Alat pengambilan sampel (drigjen) b. Jurnal penelitian Wati et al. (2022)
2.	Pembuatan dan pengaplikasian imobilisasi bakteri potensial	Metode observasi, Uji test dan dokumenter	a. Alat dan bahan buat imobilisasi (alginat, CaCl, aquades, alcohol, sentrifugasi, jarum suntik, erlenmeyer, tisu, batch reactor, autoclave dan dirigen) b. Kamera HP
3.	Perhitungan bakteri yang terenkapsulasi	Metode uji tes (MCA)	a. Medium MCA, buffer posfat, NaCl, bakteri terenkapsulasi
4.	Pengukuran parameter yang diteliti	Metode observasi dan uji tes	a. SPSS b. Anava 1 arah
5.	Analisis data peneltian	Metode observasi dan studi literartur	a. PP RI No.22 tahun 2021 b. SPSS uji <i>Paired T-test</i>

3.5 Prosedur Penelitian

Berikut merupakan kerangka konseptual dalam prosedur penelitian yang akan dilaksanakan:



Gambar 3. 6 Kerangka Konseptual Penelitian

3.5.1 Pengambilan Sampel Air

Pengambilan sampel air Sungai Kaliotik sebanyak 12 L (volume *batch reactor* sebesar 2 liter dengan 3 kali perlakuan, masing-masing ulangan sebanyak 3 kali) dimasukkan kedalam wadah yang steril dan dilakukan pada titik sampling yaitu area pasar ikan. Sampel air kemudian dihomogenkan untuk dilakukan pengujian penurunan bahan pencemar dengan imobilisasi bakteri. Pengambilan sampel air mengacu pada hasil penelitian Wati, et al. (2022) bahwa titik pencemaran paling tinggi diperoleh pada area pasar ikan Lamongan.

3.5.2 Preparasi Alat dan Bahan

Peralatan yang dibutuhkan untuk pembuatan imobilisasi bakteri yaitu cawan petri, sentrifugasi, alat suntik, jarum suntik, labu ukur 25 mL dan 250 mL, gelas ukur, blue tip, cawan petri, jarum ose, vortex, beaker glass 100 ml dan 250 ml, *batch reactor*, *autoclave*. Sedangkan bahan penelitian yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain, air sampel Sungai Kaliotik, kultur bakteri potensial (isolat koleksi laboratorium di FIKES UNISLA), aquades, alcohol, *Nutrien Agar (NA)*, *Nutrient broth (NB)*, kapas, tissue, sodium alginat (Na alginat) 4%, CaCl_2 2,5% w/v, aquades, dan larutan *buffer phosphate*.

3.5.3 Peremajaan dan Kultivasi Bakteri

Peremajaan isolat dilakukan secara aseptik dengan menambahkan sebanyak satu ose bakteri potensial yang digoreskan ke permukaan medium NA secara *streak plate* pada cawan petri dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Kemudian bakteri potensial dikultivasi dengan mengambil sebanyak satu ose bakteri dari media NA kedalam media NB 10 mL dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer $\text{OD}_{\lambda 610\text{nm}}=0,5$ (Mubarokah, 2018). Sebanyak 3% dari 10 mL NB ditambahkan ke 100 mL NB kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

3.5.4 Pembuatan Imobilisasi Bakteri

Pembuatan imobilisasi bakteri memodifikasi dari Mubarokah (2018). Preparasi sel bakteri dilakukan dengan sentrifugasi untuk memisahkan sel yang dipanen dari media NB menggunakan sentrifuge 4000 rpm 20 menit. Sel dicuci dengan menggunakan larutan aquades steril dan di-sentrifuge kembali 20 menit.

Sel-sel kemudian dipisahkan dari supernatan, dan inokulum (tablet) siap untuk difiksasi dengan alginat. Alginat 4% b/v, larutkan dalam 20 mL air suling lalu homogenkan dengan pengaduk magnet hingga alginat larut. Kemudian masukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan tambahkan air suling hingga volume 100 mL dan homogenkan.

Kemudian 13 mL alginat dilarutkan pada pelet dan dihomogenkan dengan vortex lalu gunakan alat suntik 20 ml dan jarum suntik nozzle 27 G untuk mengesktrusi per tetesnya ke larutan CaCl_2 konsentrasi 2,5% w/v, setelah itu diamkan selama 35 menit agar mengeras. Setelah mengeras, Langkah terakhir yakni disaring dan dicuci menggunakan aquades steril, simpan hasil imobilisasi tersebut yang telah berupa mikrokapsul di larutan media NB.

3.5.5 Perhitungan Bakteri yang Terenkapsulasi

Sebelum dilakukan perhitungan bakteri yang terenkapsulasi, dilakukan pengamatan morfologi kapsul dengan mikroskop optik dengan perbesaran 40x untuk mengetahui viabilitas sel bakteri yang terenkapsulasi berdasarkan Zanjani, et al. (2012) dalam Cahyono, et al. (2021).

Kemudian ditambahkan sebanyak 1 mikrokapsul dengan 9 ml buffer fosfat (pH 6,8), kemudian diaduk selama 6 jam hingga mencapai konsentrasi 4%. Kemudian encerkan dengan NaCl steril konsentrasi 0,9%, pindahkan 100 μL ke dalam agar MCA, lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam (Inova et al., 2012). Kepadatan bakteri per gram yang terbentuk dapat dihitung dengan mengacu pada Pradikaningrum (2018).

$$\text{Koloni/g} = \frac{\text{Rata-rata total koloni}}{\text{Volume yang disebar di cawan petri x factor pengenceran}}$$

3.5.6 Pengaplikasian Imobilisasi Bakteri

Pengaplikasian imobilisasi bakteri potensial yang telah terimobil menggunakan enkapsulasi alginat pada sampel air sungai Kaliotik Lamongan menggunakan *batch reactor* dapat ditunjukkan pada tabel perlakuan 3.3 berikut:

Tabel 3. 3 Perlakuan imobilisasi

No.	Perlakuan	Keterangan	Parameter yang diuji
1	Kontrol Negatif	Sample Air Sungai Kaliotik Saja di wadah	Fisika (suhu, TSS), kimia (BOD, DO, pH, fosfat, amoniak) dan mikrobiologi (total coliform) dengan mengacu pada standart baku mutu kualitas air PP No.22 tahun 2021
2	Kontrol Positif	Sample air Sungai Kaliotik ditambah dengan bakteri yang belum terimobilisasi	
3	Perlakuan	Perlakuan air Sungai Kaliotik ditambah bakteri terimobilisasi menggunakan alginat dengan konsentrasi 4%.	

Catatan: Setiap perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan

3.5.7 Pengukuran Parameter yang Diuji

3.5.7.1 TSS

Pengukuran menggunakan alat di laboratorium yakni TSS meter DR-900. Sampel air diambil dalam wadah yang telah disiapkan dari alat tersebut sampai pada ambang batas yakni 10 mL yang ditentukan, selanjutnya blanko dimasukkan pada alat dan diklik zero, kemudian blanko diambil dan dimasukkan sampel air. Selanjutnya sampel air yang diuji dimasukkan pada alat TSS meter DR-900. Setelah itu ditekan tombol read. Tunggu hingga angka hasil pengukuran tersebut muncul dilayar. Jika angka sudah tertera dalam layar catat hasilnya dan dokumentasikan.

3.5.7.2 TDS (*Total Dissolved Solid*)

Pengukuran menggunakan alat yakni TDS meter, dengan cara memasukkan langsung alat tersebut ke dalam air sampel yang akan diukur. Selanjutnya biarkan angka pada layar berjalan dan setelah angka berhenti tekan tombol hold pada alat tersebut. Kemudian hasil pengukuran sudah bisa dicatat dan didokumentasikan.

3.5.7.3 DO

Pengukuran menggunakan DO meter dengan cara pastikan alat telah terpasang dengan benar setelah itu tekan tombol power dan dilanjut dengan memasukkan pen pada DO Meter ke dalam air, kemudian setelah angka pada layar alat telah muncul dan melaju lambat maka tekan hold.

3.5.7.4 COD

Sampel air disiapkan terlebih dahulu ditabung COD yakni 2.5 mL, setelah itu sampel dan blanko dipanaskan di block gestor tabung COD pada suhu 150 °C. Selanjutnya diangkat dan didinginkan, setelah dingin tabung tersebut diambil untuk dimasukkan kedalam *Cuvette* dan angka hasil pengukuran tersebut akan berhasil tampil di layar tabung COD.

3.5.7.5 Minyak dan Lemak

Pengukuran minyak dan lemak melibatkan pihak ketiga yakni Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Dengan mengirimkan sampel uji untuk dilakukan pengujian ditempat tersebut.

3.5.8 Analisis Data Penelitian

Analisis data memodifikasi dari Pradikaningrum, (2018), dan pengaruh penambahan imobilisasi *Pseudomonas sp.* terhadap penurunan bahan pencemar air Sungai Kaliotik dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kolmogrov-Smirnov*, *Test of Homogeneity of Variance* dan *One-Way ANOVA* (Anava 1 arah). Uji *Kolmogrov-Smirnov* bertujuan untuk mengetahui hasil data berdistribusi normal atau berdistribusi tidak normal, dengan ketentuan apabila nilai signifikansi (P) lebih dari > 0.05 maka data berdistribusi normal sedangkan nilai signifikansi (P) kurang dari < 0.05 maka data berdistribusi tidak normal.

Tes of homogeneity of Variance dilakukan karena untuk mengetahui hasil data berdistribusi homogen atau tidak homogen, dengan indikator yakni nilai signifikansi (P) lebih dari > 0.05 dikatakan berdistribusi homogen sedangkan nilai signifikansi (P) kurang dari < 0.05 dikatakan berdistribusi tidak homogen. Sedangkan jika hasilnya sama dengan 0.05 maka akan dilakukan pengujian alternatif menggunakan uji *Paired T-Test* untuk mengetahui data berdistribusi homogen atau tidak homogen.

Anava 1 arah bertujuan untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh penambahan imobilisasi *Pseudomonas sp.* terhadap penurunan kadar minyak dan lemak serta untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruhnya terhadap kualitas air Sungai Kaliotik Kabupaten Lamongan, dengan ketentuan apabila nilai signifikansi (P) lebih dari > 0.05 maka tidak ada pengaruh sedangkan nilai signifikansi (P) kurang dari < 0.05 maka ada pengaruh.