

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya pada bulan September 2014 – Januari 2015.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, bunsen, *Laminar Air Flow* (LAF), botol kultur 100 mL, botol kultur 250 mL, *autoclave* (Ogawa Seiki), spektrofotometer (*Spectronic 20 Bausch-Lomb*), labu pisah, evaporator, labu evaporator, neraca analitik (Shimadzu AEI-200), gelas ukur, oven, *vortex*, thermometer, *pump* pipet volume, pipet volume, tabung cuvet, kompor listrik, spatula, corong kaca, lemari es, *counting chamber*, bunsen, *soil tester*, *micropipette* dan tip *micropipette*, indikator pH dan korek api (sebagian gambar ada pada Lampiran 2).

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Bahan isolat bakteri

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas

Airlangga. Isolat bakteri yang digunakan adalah *Micrococcus* sp. L II 61, *Pseudomonas putida* T1-8, *Bacillus subtilis* 3KP dan *Acinetobacter* sp.

2. Media pertumbuhan bakteri

Medium *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB)

3. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah akuades, n-heksan untuk mengekstrak minyak dan air fisiologis.

4. Substrat untuk uji biodegradasi

Tanah subur (tanah taman) dan pasir dengan perbandingan 1:1 (w/w), selanjutnya disebut sebagai substrat uji biodegradasi.

5. *Bulking agent* untuk uji biodegradasi

Bulking agent yang digunakan adalah serbuk gergaji dari batang pohon kelapa yang diperoleh dari industri kayu.

6. Limbah minyak goreng (jelantah)

Limbah minyak goreng diperoleh dari ibu rumah tangga.

7. Bahan habis pakai

Aluminium foil, kapas, *cling wrap*, kertas koran, kertas label, alkohol, dan spiritus.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan faktorial 5x4x2 dengan tiga kali ulangan. Perlakuan terdiri atas tiga faktor, yaitu variasi jenis bakteri terdiri atas 5 variasi (K, A, B, C, dan D), lama waktu inkubasi terdiri atas 4 variasi (M1, M2,

M4, dan M6), dan pemberian *bulking agent* terdiri atas 2 variasi (- dan +).

Rincian perlakuan dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Perlakuan variasi jenis bakteri, lama waktu inkubasi, dan pemberian *bulking agent*

| Perlakuan Variasi Jenis Bakteri | <i>Bulking Agent</i> | Lama Waktu Inkubasi (Minggu) | | | |
|---------------------------------|----------------------|------------------------------|--------|--------|--------|
| | | M1 | M2 | M4 | M6 |
| K | - | K – M1 | K – M2 | K – M4 | K – M6 |
| | + | K + M1 | K + M2 | K + M4 | K + M6 |
| A | - | A – M1 | A – M2 | A – M4 | A – M6 |
| | + | A + M1 | A + M2 | A + M4 | A + M6 |
| B | - | B – M1 | B – M2 | B – M4 | B – M6 |
| | + | B + M1 | B + M2 | B + M4 | B + M6 |
| C | - | C – M1 | C – M2 | C – M4 | C – M6 |
| | + | C + M1 | C + M2 | C + M4 | C + M6 |
| D | - | D – M1 | D – M2 | D – M4 | D – M6 |
| | + | D + M1 | D + M2 | D + M4 | D + M6 |

keterangan :

K : kontrol tanpa pemberian bakteri

A : dengan penambahan bakteri *Micrococcus* sp.

B : dengan penambahan bakteri *Micrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp.

C : dengan penambahan bakteri *Acinetobacter* sp. *Bacillus subtilis*, dan *Pseudomonas putida*

D : dengan penambahan bakteri *Micrococcus* sp. *Acinetobacter* sp. *Bacillus subtilis*, dan *Pseudomonas putida*

M1 : minggu ke - 1

M2 : minggu ke - 2

M4 : minggu ke - 4

M6 : minggu ke - 6

- : perlakuan tanpa pemberian *bulking agent*

+ : perlakuan dengan pemberian *bulking agent*

3.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : variasi jenis bakteri, pemberian *bulking agent* serbuk gergaji (g), lama waktu inkubasi (minggu), dan kombinasi ketiganya.

- b. Variabel terikat : jumlah total bakteri (CFU/g-tanah), kadar minyak jelantah (g/g-tanah) dan pH tanah.
- c. Variabel terkendali : konsentrasi perlakuan variasi jenis bakteri (20%), nilai OD masing masing bakteri (0,5 pada panjang gelombang 600 nm), massa *bulking agent* serbuk gergaji (2g), massa substrat uji (10g), volume minyak jelantah (2mL), kelembaban (%), dan suhu inkubasi ($^{\circ}\text{C}$).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Peremajaan isolat

Peremajaan isolat bakteri dilakukan dengan menginokulasikan masing - masing kultur murni pada media NA miring dengan menggunakan metode *streak* secara aseptik. Kemudian diinkubasikan pada suhu ruang ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) selama 24 jam hingga nampak koloni yang tumbuh. Selanjutnya kultur disimpan dalam lemari es untuk perlakuan selanjutnya.

3.5.2 Pembuatan suspensi bakteri uji

- a. Menyiapkan botol steril ukuran 150 mL sebanyak 8 botol (masing-masing bakteri 2 botol)
- b. Mengisi botol steril yang telah disiapkan dengan media NB 100 mL.
- c. Mengambil secara steril dua ose biakan bakteri untuk kultur suspensi.
- d. Menginokulasikan ke dalam media NB 100 mL kemudian menghomogenkan dengan vortex.

- e. Menginkubasi kultur selama 10 - 18 jam pada suhu ruangan dengan di shaker.
- f. Mengukur nilai OD = 0,5 dengan $\lambda = 600$ nm. Suspensi ini digunakan dalam perlakuan selanjutnya.
- g. Bila OD tidak sama dengan 0.5 dapat dilakukan dengan memasukkan 4 mL suspensi bakteri dalam tabung *cuvet* kemudian mengukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer. Jika OD yang diukur melebihi 0,5 maka dilakukan pengenceran dengan menggunakan medium NB steril menggunakan rumus :

$$n_1 \cdot V_1 = n_2 \cdot V_2$$

Dimana n_1 : OD suspensi awal

n_2 : OD yang telah ditentukan

V_1 : volume suspensi awal yang ada di dalam botol,

V_2 : volume total hasil pengenceran

$$V_2 = (n_1 \cdot V_1) / n_2$$

- h. Biakan yang sudah memiliki OD = 0,5 tersebut digunakan untuk perlakuan selanjutnya.

3.5.3 Pembuatan konsorsium jenis bakteri untuk perlakuan

3.5.3.1 Perlakuan A yang tersusun atas bakteri jenis *Micrococcus* sp.

Menghitung volume bakteri yang harus diambil dari setiap stok suspensi bakteri uji dengan $A_{600} = 0,5$. Untuk perlakuan A hanya terdiri atas satu bakteri, jadi diambil 2 mL (20% x 10 g total substrat uji).

3.5.3.2 Perlakuan B yang tersusun atas bakteri jenis *Micrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp.

Menghitung volume bakteri yang harus diambil dari setiap stok suspensi bakteri uji dengan $A_{600} = 0,5$. Caranya adalah dengan:

- a. Konsentrasi total bakteri yang digunakan adalah 2 mL (20% x 10 g total substansi uji), penyusun perlakuan adalah 2 bakteri. Jadi volume masing – masing suspensi bakteri yang diambil adalah $\frac{1}{2} \times 2 \text{ mL} = 1 \text{ mL}$.
- b. Membuat perlakuan B dengan mencampurkan masing-masing bakteri sebanyak 1 mL.

3.5.3.3 Perlakuan C yang tersusun atas bakteri jenis *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, dan *Acinetobacter* sp.

Menghitung volume bakteri yang harus diambil dari setiap stok suspensi bakteri uji dengan $A_{600} = 0,5$. Caranya adalah dengan:

- a. Konsentrasi total bakteri yang digunakan adalah 2 mL (20% x 10 g total substansi uji), penyusun perlakuan adalah 3 bakteri. Jadi volume masing – masing suspensi bakteri yang diambil adalah $\frac{1}{3} \times 2 \text{ mL} = 0,67 \text{ mL}$.
- b. Membuat perlakuan C dengan mencampurkan masing-masing bakteri sebanyak 0,67 mL.

3.5.3.4 Perlakuan D yang tersusun atas bakteri jenis *Acinetobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, dan *Micrococcus* sp.

Menghitung volume bakteri yang harus diambil dari setiap stok suspensi bakteri uji dengan $A_{600} = 0,5$. Caranya adalah dengan:

- a. Konsentrasi total bakteri yang digunakan adalah 2 mL (20% x 10 g total substansi uji), penyusun perlakuan adalah 4 bakteri. Jadi volume masing – masing suspensi bakteri yang diambil adalah $1/4 \times 2 \text{ mL} = 0,5 \text{ mL}$.
- b. Membuat perlakuan D dengan mencampurkan masing-masing bakteri sebanyak 0,5 mL.

3.5.4 Persiapan substrat untuk perlakuan

3.5.4.1 Persiapan tanah dan pasir

- a. Mengayak tanah subur (tanah taman) dan pasir menggunakan mesh ukuran 20. Rincian substrat yang dibutuhkan adalah untuk pengukuran kadar minyak = 8 g x 5 perlakuan x 4 perlakuan waktu inkubasi x 3 ulangan = 480 g, untuk *Total Plate Count* (TPC) = 8 g x 5 perlakuan x 4 perlakuan waktu inkubasi = 160 g, untuk kelembaban = 8 g x 5 perlakuan x 4 perlakuan waktu inkubasi = 160 g. Jadi total substrat yang dibutuhkan adalah 800 g.
- b. Melakukan pencampuran tanah dan pasir dengan perbandingan 1:1. Sehingga perbandingan tanah dan pasir adalah 400 : 400 = 800 g (untuk seluruh perlakuan).

- c. Mencampur tanah subur (tanah taman) dan pasir (selanjutnya disebut substrat uji) dan dihomogenkan dengan mengaduk sampai rata.

3.5.4.2 Persiapan *bulking agent* (serbuk gergaji)

- a. Mengayak serbuk gergaji dengan menggunakan mess ukuran 20.
- b. Menimbang sebanyak 2 g untuk masing-masing perlakuan. Serbuk gergaji yang dibutuhkan untuk pengukuran kadar minyak = $2 \text{ g} \times 5 \text{ perlakuan} \times 4 \text{ perlakuan waktu inkubasi} \times 3 \text{ ulangan} = 120 \text{ g}$, untuk TPC = $2 \text{ g} \times 5 \text{ perlakuan} \times 4 \text{ perlakuan waktu inkubasi} = 40 \text{ g}$, untuk kelembaban = $2 \text{ g} \times 5 \text{ perlakuan} \times 4 \text{ perlakuan waktu inkubasi} = 40 \text{ g}$.
Jadi total serbuk gergaji yang dibutuhkan adalah 200 g.

3.5.4.3 Persiapan limbah minyak goreng (jelantah)

Limbah minyak goreng (jelantah) yang sudah diambil dari seorang ibu rumah tangga, disaring untuk menghilangkan sisa-sisa penggorengan dan pengotor lainnya. Minyak goreng yang dibutuhkan adalah untuk pengukuran kadar minyak = $2 \text{ mL} \times 5 \text{ perlakuan} \times 4 \text{ perlakuan waktu inkubasi} \times 3 \text{ ulangan} = 120 \text{ mL}$, untuk TPC = $2 \text{ mL} \times 5 \text{ perlakuan} \times 4 \text{ perlakuan waktu inkubasi} = 40 \text{ mL}$. Kelembaban = $2 \text{ mL} \times 5 \text{ perlakuan} \times 4 \text{ perlakuan waktu inkubasi} = 40 \text{ mL}$. Jadi total volume limbah minyak goreng yang dibutuhkan adalah 200 mL.

3.5.5 Perlakuan uji biodegradasi limbah minyak goreng (jelantah)

- a. Menyiapkan 200 botol perlakuan ukuran 100 mL (120 botol untuk pengukuran kadar minyak, 40 botol untuk TPC, dan 40 botol untuk kelembaban). Botol dibersihkan dan disterilisasi.

- b. Menambahkan 8 g substrat uji (tanah berpasir) ke dalam botol perlakuan (untuk perlakuan tanpa *bulking agent* substrat uji yang ditambahkan sebanyak 10 g).
- c. Menambahkan 2 g *bulking agent* (serbuk gergaji) dan mengaduknya kembali sampai homogen (untuk perlakuan yang tanpa *bulking agent* tidak ditambah serbuk gergaji).
- d. Memasukkan 2 mL limbah minyak goreng ke dalam botol perlakuan yang sudah berisi substrat uji dan *bulking agent* kemudian mengaduknya dengan spatula besi steril sampai homogen.
- e. Menambahkan 2 mL akuades steril untuk menjaga kelembaban.
- f. Memasukkan perlakuan dengan bakteri yang telah disiapkan.
- g. Mengaduk kembali semua campuran tersebut dengan menggunakan spatula kaca steril hingga benar - benar homogen.
- h. Menginkubasi semua perlakuan pada suhu ruangan selama 1, 2, 4, dan 6 minggu.
- i. Kelembaban tanah pada botol perlakuan (menggunakan botol perlakuan khusus untuk kelembapan) dikontrol sekitar 50-80% dengan cara menambahkan akuades steril (Hadi, 2011). Setiap minggu presentase kelembaban tanah dalam botol perlakuan dihitung dengan cara :

$$\% \text{ kelembaban tanah} = \frac{Bb - Bk}{Tk} 100\%$$

keterangan :

Bb : massa botol berisi tanah tanpa tutup sebelum dikeringkan dengan oven selama waktu inkubasi tertentu (g)

Bk : massa konstan botol berisi tanah tanpa tutup setelah dikeringkan dengan oven selama waktu inkubasi tertentu (g)

Tk : massa tanah setelah dikeringkan selama waktu inkubasi tertentu (g)

3.5.6 Pengukuran kemampuan biodegradasi

3.5.6.1 Penghitungan *Total Plate Count* (TPC)

Penghitungan jumlah total mikroba (CFU/mL) dihitung dengan menggunakan metode *pour plate* di cawan petri. Untuk melakukan metode TPC yang dilakukan adalah :

1. Menyiapkan botol perlakuan yang akan dihitung jumlah mikrobanya.
2. Menimbang botol perlakuan untuk diketahui massa tanahnya.
3. Menambahkan 90 mL air fisiologis steril ke dalam botol perlakuan yang akan di TPC. Kemudian menghomogenkan dengan menggunakan spatula kaca lalu di *vortex* dan diendapkan selama 5 menit.
4. Mengambil suspensi dari masing – masing botol perlakuan sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam 9 mL air fisiologis steril yang sudah disiapkan dan melakukan pengenceran berseri (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan seterusnya sesuai kebutuhan).
5. Melakukan *pour plate* dengan cara memasukkan 1 mL sampel dari hasil pengenceran (3 pengenceran terakhir) ke dalam cawan petri,

kemudian menambahkan \pm 15 mL media NA (*pour plate* dilakukan 2 kali ulangan).

6. Menggoyangkan cawan sampai homogen dan membiarkan media sampai memadat.
7. Menginkubasi cawan petri dalam keadaan terbalik (agar uap air tidak menetes pada media agar) selama 1-2 hari.
8. Menghitung jumlah bakteri hidup yang tumbuh pada NA di cawan petri, data yang memenuhi persyaratan (30 – 300 koloni) dikalikan dengan 1/faktor pengenceran.
9. Mengkonversi satuan CFU/mL ke dalam CFU/g dengan cara mengalikan setiap data dengan 9 mL/g (90 mL air fisiologis/ 10 g tanah).

3.5.6.2 Pengukuran kadar limbah minyak goreng (jelantah) dengan menggunakan analisis gravimetri (Eaton, dkk., 2005)

1. Mengeringkan tanah yang ada di dalam botol perlakuan dengan cara di oven pada suhu 75⁰ C selama 2 hari. Kemudian menghomogenkan dengan menggunakan spatula kaca.
2. Menambahkan n – heksan (untuk ekstraksi) secara bertahap (per 25 mL) sebanyak 75 mL ke dalam botol perlakuan yang sudah di oven.
3. Dilakukan homogenisasi dengan cara di-*vortex* selama 2 – 3 menit.
4. Tanah dibiarkan mengendap, kemudian diambil fase organiknya (n-heksan + minyak) dengan diambil dengan pipet.
5. Menuang ekstrak ke dalam botol hasil ekstraksi dan ditutup rapat.

6. Menuang ekstrak ke dalam tabung evaporasi kemudian botol dicuci dengan penambahan 5 mL n-heksan sampai volume 80 mL hal ini untuk meminimalisir minyak yang tersisa di botol.
7. Ekstrak dan n-heksan dievaporasi dalam evaporator. Residu ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik.

3.6.5.3 Mengetahui pengaruh pH terhadap proses biodegradasi

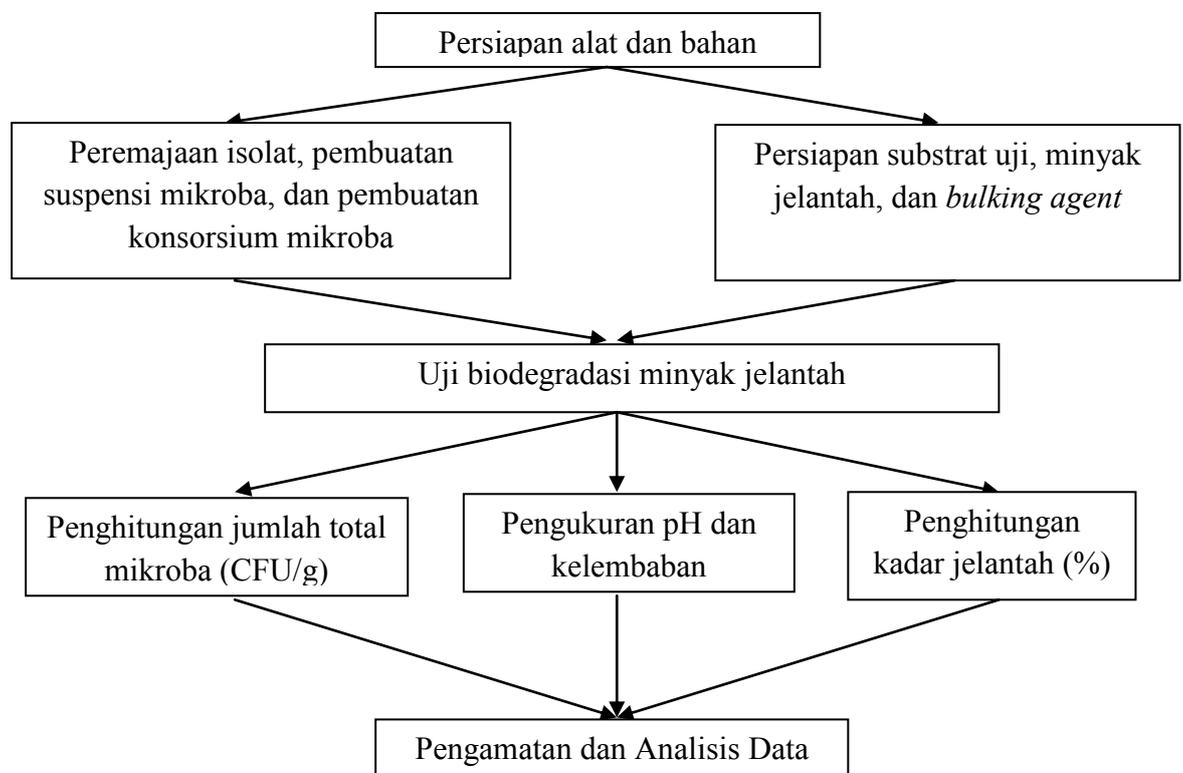
Tingkat keasaman (pH) dapat berubah selama pertumbuhan mikroba. Untuk mengetahui pengaruh perubahan pH terhadap proses degradasi maka dilakukan pengukuran pH awal dan pH akhir selama proses biodegradasi. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mengukur langsung pH tanah dengan menggunakan indikator pH.

3.6 Analisis Data Penelitian

Data pH dan kelembaban selama proses biodegradasi dianalisis secara deskriptif. Data jumlah total mikroba (CFU/g-tanah) dan kadar limbah minyak goreng (persentase degradasi jelantah) dianalisis secara statistik. Analisis statistik menggunakan program *Statistical Package for Special Science* (SPSS) versi 21 dengan derajat signifikansi 5%, $p=0,05$. Pertama, mencari distribusi data (normal dan homogen) menggunakan uji *One Sample Kolmogorov Smirnov* dan *Levene Test*. Data normal dan homogen apabila $p \geq 0,05$. Jika data berdistribusi normal dan homogen dilakukan uji *Two Way Anova* sedangkan jika datanya normal-tidak homogen maka dilakukan uji *Brown Forsythe*. Pada uji *Two Way Anova* apabila $p \leq 0,05$ maka ada pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat. Jika ada

pengaruh, maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui beda nyata antarperlakuan, uji *Duncan* untuk data yang homogen, dan uji *Games-Howell* untuk data yang tidak homogen.

3.7 Skema Metode Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alur pelaksanaan penelitian