

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga (FST Unair), Surabaya pada bulan Juli sampai dengan Desember 2014.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* (Ogawa Seiki Co. LTD OSK-6500), spektrofotometer (Milton Ray Co. Spectronic-20), neraca analitik (Shimadzu AEL-200), neraca digital (Ohaus Co. Scout Pro-SPS2001F), evaporator, *double hot plate* (Rommeisbacher), *waterbath* (JULABO TW8), oven (Heraeus UT6060), *shaker incubator* (Ogawa Seiki Co. LTD OSK-6311), *Laminar Air Flow* (LAF) (ESCO®), termometer raksa, *vortex* (Thermolyne M37610-33), labu pisah volume 250 mL, pembakar bunsen, pH meter (Crison GLP-21), *disposable Petridish*, botol kultur, spatula, tabung reaksi, corong plastik, pipet tetes, pipet volum, *pump* pipet volum, mikropipet, tip mikropipet, gelas *Beaker*, labu Erlenmeyer, kuvet, botol vial, jarum ose, rak tabung reaksi, gelas ukur, dan labu evaporator. (Sebagian gambar alat dapat dilihat di lampiran 4)

### 3.2.2 Bahan

Dalam penelitian ini bahan-bahan yang digunakan adalah:

#### 1. Konsorsium mikroba

Konsorsium mikroba yang digunakan adalah bakteri hasil koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi FST Unair, Surabaya yang terdiri atas bakteri penghasil biosurfaktan, bakteri dan *yeast* hidrokarbonoklastik.

Konsorsium mikroba F1 (3 jenis *yeast* hidrokarbonoklastik), F2 (4 jenis bakteri biosurfaktan), F3 (7 jenis bakteri hidrokarbonoklastik), F4 (4 jenis bakteri biosurfaktan + 3 jenis *yeast* hidrokarbonoklastik), dan F5 (7 jenis bakteri hidrokarbonoklastik + 3 jenis *yeast* hidrokarbonoklastik).

#### 2. Lumpur minyak (*oil sludge*)

Lumpur minyak (*oil sludge*) yang digunakan pada penelitian ini berasal dari PT VICO Indonesia yang diambil dari lokasi pengeboran minyak di Muara Badak, Kalimantan Timur (karakteristik *oil sludge* disajikan pada lampiran 3).

#### 3. Media dan bahan lain

- Media
  - a. Media peremajaan mikroba uji berupa *Nutrient Agar* (NA) (OXOID) untuk bakteri dan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (OXOID) untuk *yeast*.
  - b. Media pembuatan suspensi mikroba uji berupa *Nutrient Broth* (NB) (OXOID) untuk bakteri dan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) (MERCK) untuk *yeast*.

- c. Media uji biodegradasi lumpur minyak *oil sludge* pada kultur cair berupa AMS komposisi dari Pruthi and Cameotra (1997) dengan penambahan molase sebagai media nutrisi tambahan.
- d. Media pertumbuhan mikroba untuk menghitung jumlah total mikroba (CFU/mL) pada media umum *Nutrient Agar* (NA) (OXOID) untuk bakteri dan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (OXOID) untuk *yeast*.
- Bahan lain yang digunakan  
Pelarut organik (n-heksan), etanol, *tween-20* (=CMC), air garam fisiologis, kertas indikator pH, spiritus, alkohol 70%, *aluminium foil*, kapas, *cling wrap*, kertas pembungkus.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 3x7 dengan tiga kali ulangan. Perlakuan terdiri atas dua faktor, yaitu variasi konsorsium mikroba dan lama waktu inkubasi. Faktor variasi konsorsium mikroba terdiri atas tujuh level, yaitu K1, K2, F1, F2, F3, F4, dan F5. Faktor lama waktu inkubasi terdiri atas tiga level, yaitu H3, H7, dan H14. Setiap perlakuan diulang tiga kali. Rincian perlakuan dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Rancangan penelitian.

Waktu inkubasi	Variasi konsorsium mikroba						
	K1	K2	F1	F2	F3	F4	F5
H3	K1H3	K2H3	F1H3	F2H3	F3H3	F4H3	F5H3
H7	K1H7	K2H7	F1H7	F2H7	F3H7	F4H7	F5H7
H14	K1H14	K2H14	F1H14	F2H14	F3H14	F4H14	F5H14

Sehingga dalam penelitian ini terdapat 21 perlakuan, seperti di bawah ini:

K1 : *tween-20* (=CMC) + *oil sludge*.

K2 : AMS molase + akuades + *oil sludge*.

H3 : Waktu inkubasi 3 hari.

H7 : Waktu inkubasi 7 hari.

H14 : Waktu inkubasi 14 hari.

F1 : 3 jenis *yeast* (*Candida famata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilopsis*).

F2 : 4 jenis bakteri (*Micrococcus* sp., *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter faecalis* type II, *Bacillus subtilis*).

F3 : 7 jenis bakteri (*Micrococcus* sp., *Actinobacillus* sp., *Acinetobacter faecalis* type II, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas fluorescens*).

F4 : 3 jenis *yeast* (*Candida famata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilopsis*) dan 4 jenis bakteri (*Micrococcus* sp., *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter faecalis* type II, *Bacillus subtilis*).

F5 : 3 jenis *yeast* (*Candida famata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilopsis*) dan 7 jenis bakteri (*Micrococcus* sp., *Actinobacillus* sp., *Acinetobacter faecalis* type II, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas fluorescens*).

Konsorsium mikroba ditumbuhkan dalam media AMS molase + *oil sludge*.

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas : konsorsium mikroba dan waktu inkubasi.

Variabel terikat : jumlah total mikroba (CFU/mL), persentase degradasi *oil sludge* (%).

Variabel terkendali : nutrisi, volume media, nilai OD, suhu, persentase inokulum, agitasi, pH awal media, berat awal *oil sludge*.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Peremajaan mikroba uji

Isolat murni mikroba penyusun konsorsium F1, F2, F3, F4 dan F5 yaitu bakteri penghasil biosurfaktan dan mikroba (bakteri dan *yeast*) hidrokarbonoklastik koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi FST Unair. Mikroba diremajakan dengan cara menginokulasikan kultur murni pada media NA miring untuk bakteri dan SDA miring untuk *yeast* dengan metode *streak* secara aseptik. Kemudian diinkubasikan pada suhu ruang ( $\pm 28$  °C) selama 24 jam hingga nampak koloni yang tumbuh. Selanjutnya mikroba yang tumbuh tersebut dapat digunakan dalam penelitian atau digunakan sebagai stok mikroba uji penyusun konsorsium bakteri. Stok mikroba uji tersebut disimpan dalam lemari es dengan suhu 4 °C. Peremajaan isolat murni mikroba dilakukan sehari sebelum dibuat suspensi konsorsium mikroba dan pada *yeast* dilakukan dua hari sebelum dibuat suspensi mikroba.

### 3.5.2 Pembuatan media

#### a. Media peremajaan mikroba

##### - *Nutrient Agar (NA)*

Pembuatan 1 L media *Nutrient Agar* (OXOID) dilakukan dengan melarutkan NA sebanyak 28 g dalam 1 L akuades. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Takaran NA dapat dikonversi sesuai dengan volume NA yang dibuat.

##### - *Nutrient Broth (NB)*

Pembuatan 1 L media *Nutrient Broth* (OXOID) dilakukan dengan melarutkan NB sebanyak 13 g dalam 1 L akuades. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Takaran NB dapat dikonversi sesuai dengan volume NB yang dibuat.

##### - *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)*

Pembuatan 1 L media *Sabouraud Dextrose Agar* (OXOID) dilakukan dengan melarutkan SDA sebanyak 65 g dilarutkan dalam 1 L akuades. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Takaran NB dapat dikonversi sesuai dengan volume SDA yang dibuat.

##### - *Sabouraud Dextrose Broth (SDB)*

Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Broth* (MERCK) dilakukan dengan melarutkan SDB sebanyak 30 g dilarutkan dalam 1 L akuades. Selanjutnya media

disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Takaran NB dapat dikonversi sesuai dengan volume SDB yang dibuat.

### **b. Media kultur**

Media kultur terdiri atas AMS dan molase. AMS yang digunakan adalah AMS komposisi dari Pruthi *and* Cameotra (1997) yang terdiri atas unsur makro dan mikro nutrien yang dilarutkan dalam 1000 mL akuades. Unsur makro (g/L) meliputi:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (5,0);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3,0); NaCl (10);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01);  $\text{CaCl}_2$  (0,0133). Unsur mikro (g/L) meliputi:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,0005);  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,001);  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,001);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,001);  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,005);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,001).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dilarutkan dalam 50 mL aquades, dan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 50 mL aquades. Unsur makro dan unsur mikro lainnya dilarutkan dalam 900 mL akuades. Pembuatan molase dilakukan dengan melarutkan molase 100% pada akuades dengan perbandingan 1:1. Kemudian diendapkan dan diambil lapisan bagian atas. Molase tersebut ditambahkan pada larutan unsur makro dan mikro nutrien sebanyak 2% (v/v). Larutan dihomogenkan dengan menggunakan pengaduk magnetik dan pH larutan dibuat hingga mencapai pH 7 dengan menambahkan NaOH 4 N atau HCl 0,1 N ke dalam AMS. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Selanjutnya larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  serta larutan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dimasukkan dalam larutan unsur makro dan mikro.

### **3.5.3 Pembuatan suspensi mikroba**

Pembuatan suspensi mikroba dilakukan dengan menyiapkan botol kultur 100 ml sebanyak jumlah mikroba penyusun konsorsium (7 bakteri + 3 yeast) yang telah

diisi NB untuk bakteri dan SDB untuk *yeast* dengan volume 30 ml kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Kemudian masing-masing bakteri diinokulasikan pada media NB dan *yeast* pada media SDB, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Pengukuran dan penetapan absorbansi pada OD = 0,5 dengan  $\lambda = 600$  nm dengan cara memasukkan 4 ml suspensi bakteri dalam kuvet, kemudian mengukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer. Jika OD yang terukur melebihi 0,5 maka dilakukan pengenceran dengan NB. Pengenceran suspensi untuk mendapatkan OD = 0,5 dengan  $\lambda = 600$  nm dapat menggunakan rumus:

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

Keterangan:

$n_1$  : OD suspensi awal, misalnya = 0,8 nm

$V_1$  : volume suspensi awal yang ada dalam botol, (20 ml – 4 ml = 16 ml)

$n_2$  : OD yang telah ditentukan, OD = 0,5 nm

$V_2$  : volume total hasil pengenceran, misalkan:

$$V_1 = (n_1 \cdot V_1) / n_2 = (0,8 \cdot 16) / 0,5 = 25,6 \text{ ml}$$

Jadi volume NB yang harus ditambahkan pada suspensi sampel awal = 25,6 ml – 16 ml = 9,6 ml (Wenti, 2012).

### 3.5.4 Pembuatan konsorsium mikroba

Masing-masing suspensi mikroba OD = 0,5 dengan  $\lambda = 600$  nm dihitung volumenya yang ditambahkan pada masing-masing perlakuan. Pada masing-masing botol kultur volume total 30 mL yang terdiri atas konsorsium mikroba 4% (1,2 mL), AMS molase sebanyak 96% (28,2 mL), dan 1 g *oil sludge*. Untuk konsorsium F1, F2, F3, F4 dan F5, masing-masing dibutuhkan 4% (1,2 mL) tiap kultur dan kontrol tanpa penambahan isolat mikroba. Misalnya, pada konsorsium F1 terdiri atas 3 jenis mikroba,



maka volume masing-masing suspensi mikroba yang ditambahkan ke dalam botol kultur adalah 0,4 mL (Wenti, 2012).

### **3.5.5 Uji efektivitas biodegradasi oleh konsorsium mikroba pada kultur cair dengan substrat uji *oil sludge***

Untuk mengetahui efektivitas biodegradasi oleh konsorsium mikroba, dilakukan dengan metode degradasi minyak modifikasi dari Latha *and* Kalaivani, (2012) pada perlakuan K1, K2, F1, F2, F3, F4 dan F5 dengan disiapkan sebanyak 63 botol kultur steril volume 250 mL, kemudian diisi dengan substrat berupa *oil sludge* sebanyak 1 g. Selanjutnya ditambahkan media AMS molase sebanyak 96% (28,8 mL). Kemudian diinokulasikan konsorsium mikroba sebanyak 4% (1,2 mL) pada kultur cair dan diinkubasikan pada *shaker inkubator* dengan kecepatan 120 rpm, suhu 30 °C selama 3, 7, dan 14 hari. Kultur pada perlakuan kontrol tidak ditambahkan konsorsium mikroba eksogenous.

### **3.5.6 Pengukuran penurunan kadar *oil sludge* pada kultur cair dengan metode gravimetri**

Untuk mengetahui berat *oil sludge* yang tersisa selama perlakuan, dilakukan dengan metode gravimetri modifikasi dari Latha *and* Kalaivani, (2009) dan Panda *et al.*, (2013) pada perlakuan K1, K2, F1, F2, F3, F4 dan F5 dengan penyiapan botol perlakuan untuk analisis gravimetri yang sudah selesai masa inkubasinya, labu pemisah beserta botol-botol yang bebas lemak dan air, serta masker, kertas *tissue* dan *glove*. Setelah kultur selesai masa inkubasinya, dilakukan pemisahan antara fase cair dan fase

padat. Pada fase cair dilakukan ekstraksi menggunakan labu pisah sedangkan fase padat dilakukan ekstraksi menggunakan tabung reaksi dan *vortex*.

Pada ekstraksi fase cair, 15 mL kultur dituangkan pada labu pisah. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan n-heksan pada perbandingan 1 : 2 yaitu 15 mL kultur : 30 mL n-heksan dengan tiga tahap penambahan (10 mL-10 mL-10 mL). Kemudian dihomogenkan dengan cara mengocok campuran tersebut selama 15 menit, selanjutnya didiamkan untuk memisahkan fase cair dan fase organik. Fase cair dan fase organik yang terbentuk dipisahkan dan ditempatkan pada botol yang berbeda. Jika terbentuk emulsi maka dilakukan pemecahan emulsi menggunakan *ethanol* absolut 5 mL. Kemudian dilakukan evaporasi hasil gravimetri selama  $\pm 20$  menit, dengan titik didih n-heksan sebesar 60-69 °C.

Pada ekstraksi fase padat, dilakukan pembilasan botol kultur dengan n-heksan 10 mL. Selanjutnya hasil pencucian ditempatkan pada tabung reaksi dan didiamkan untuk memisahkan fase organik dan fase sedimen. Fase organik yang terbentuk dipisahkan dari fase sedimen dan ditempatkan pada botol vial. Selanjutnya fase sedimen dilakukan pencucian dengan n-heksan 5 mL sebanyak 6 kali. Kemudian dilakukan evaporasi hasil gravimetri selama  $\pm 20$  menit, dengan titik didih n-heksan sebesar 60-69 °C.

Metode gravimetri dilakukan untuk mengetahui berat minyak yang tersisa selama perlakuan, misalkan dari analisis tersebut didapatkan data sebagai berikut:

$$W_{\text{labu}} = 72,00 \text{ g}$$

$$W_{\text{labu} + \text{minyak}} = 72,04 \text{ g}$$

$$W_{\text{minyak}} = 72,04 \text{ g} - 72,00 \text{ g}$$

$$= 0,04 \text{ g}$$

Keterangan:

$W_{\text{labu}}$  : berat labu evaporator

$W_{\text{labu} + \text{minyak}}$  : berat labu yang berisi minyak setelah proses gravimetri

$W_{\text{minyak}}$  : berat residu ( $W_{\text{labu} + \text{minyak}} - W_{\text{labu}}$ ) yang tidak terdegradasi selama waktu inkubasi tertentu.

Untuk menghitung persentase biodegradasi *oil sludge*, menggunakan formula:

$$\% B = \frac{(W_0 - W_n)}{W_0} \times 100$$

Keterangan:

$\% B$  : persentase biodegradasi *oil sludge*

$W_0$  : berat minyak awal (g)

$W_n$  : berat minyak akhir (g) yaitu minyak dari fase cair dan minyak dari fase padat

### 3.5.7 Penghitungan jumlah total mikroba (CFU/mL)

Penghitungan jumlah total mikroba (CFU/mL) dilakukan dengan metode *total plate count* dari Ibout and Bajhaiya, (2013). Penyiapan botol kultur untuk analisis TPC yang sudah selesai masa inkubasinya, tabung reaksi yang telah berisi masing-masing 9,9 mL air fisiologis steril (jumlah tabung sesuai dengan banyak pengenceran yang ditetapkan), dan 45 cawan petri steril. Dilakukan pengenceran berseri ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ , dan seterusnya sesuai kebutuhan) pada air fisiologis steril yang sudah disiapkan. Selanjutnya dilakukan *pour plate* dengan cara memasukkan 1 mL sampel dari suatu seri pengenceran dalam cawan petri dan ditambahkan  $\pm$  15 mL NA untuk bakteri dan SDA untuk *yeast*, kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyang seperti angka delapan. Pada analisis TPC *yeast* perlu ditambahkan antibiotik (kloramfenikol) 1 mL sebelum dihomogenkan. Hasil *pour plate* didiamkan agar media memadat, selanjutnya

*Petridish* diinkubasikan dalam keadaan terbalik agar uap air tidak menetes ke agar, dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah total mikroba (CFU/mL) yang tumbuh menggunakan *colony counter* kemudian hasilnya dikalikan dengan 1/ faktor pengenceran.

### 3.5.8 Pengukuran pH

Kultur yang sudah selesai masa inkubasinya dilakukan pengukuran nilai pH menggunakan indikator pH. Pengukuran pH dilakukan pada masing-masing botol kultur dengan menggunakan metode Springer (2006).

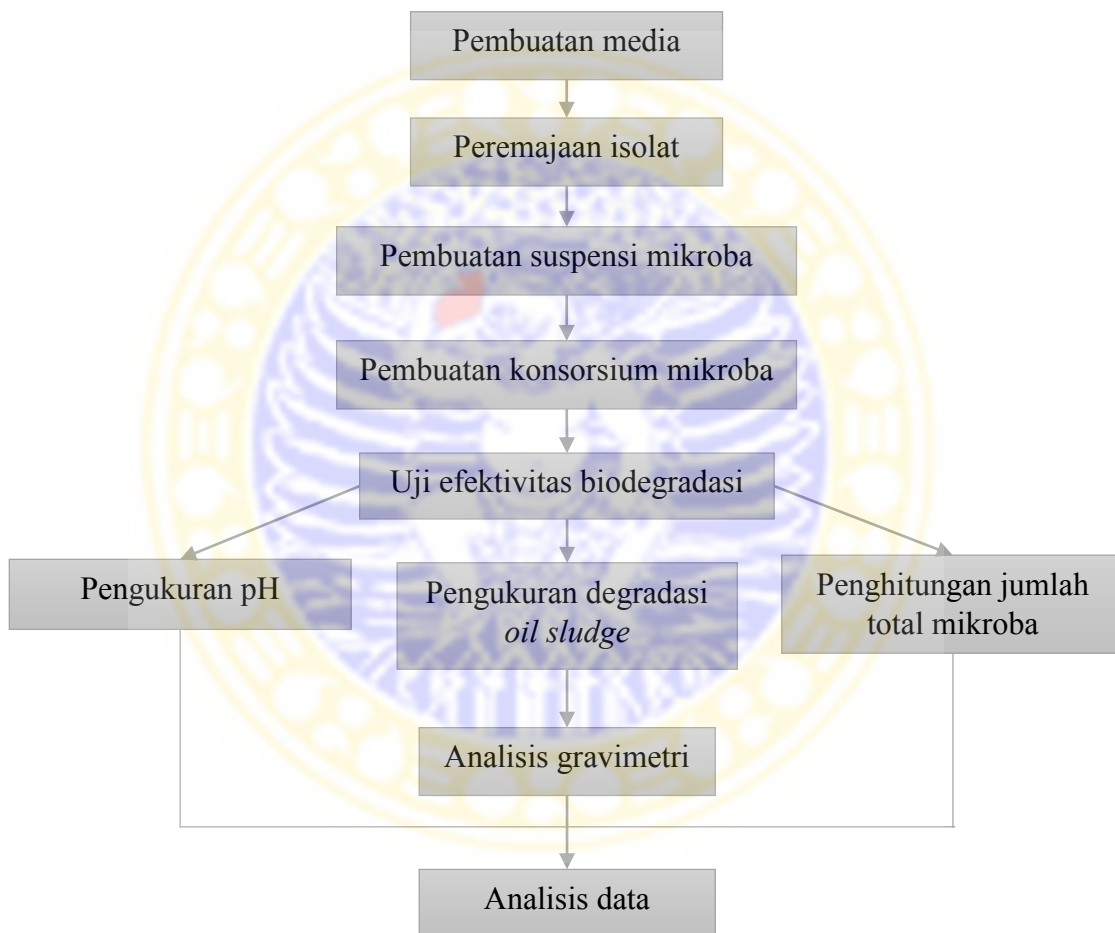
### 3.6 Analisis Data Penelitian

Dari berbagai perlakuan (F1, F2, F3, F4 dan F5) diperoleh data berupa persentase degradasi *oil sludge* (%), nilai rata-rata jumlah total mikroba (CFU/mL) bakteri dan *yeast* hidrokarbonoklastik, serta perubahan pH. Dari data tersebut, untuk persentase degradasi *oil sludge* (%) dan nilai rata-rata jumlah total mikroba (CFU/mL) dianalisis secara statistik. Sedangkan perubahan pH dianalisis secara deskriptif.

Pada data persentase degradasi *oil sludge* (%) dan jumlah total mikroba (CFU/mL) terlebih dahulu diuji menggunakan *One sample Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui suatu data berdistribusi normal ( $p\text{-value} \geq 0,05$ ) atau tidak. Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas. Jika data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan *Brown-Forsythe Test* (derajat signifikansi ( $\alpha$ ) = 0,05), kemudian dilanjutkan dengan Uji *Games-Howell* untuk mengetahui pengaruh pada masing-masing variabel. Pada data yang homogen dilanjutkan dengan uji *Two-way Analysis of Varians*

(ANOVA) ( $\alpha = 0,05$ ), kemudian dilanjutkan dengan uji *Duncan* untuk mengetahui formulasi terbaik pada perlakuan.

### 3.7 Kerangka Alur Penelitian



Gambar 4. Kerangka alur penelitian