

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai September 2017. Tempat pengambilan sampel dilaksanakan di PT. Tunas Baru Lampung Tbk Cabang Palembang, di KM 14 Tanah Emas Kecamatan Talang Kelapa Kabupaten Banyuasin, Sumatera Selatan. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Biologi dan Kesuburan Tanah Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian dan Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, Inderalaya.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu : 1) alat-alat tulis, 2) aluminium foil, 3) *autoklaf*, 4) *bunsen*, 5) cawan petri, 6) tisu, 7) *soil taster*, 8) *Haemocytometer*, 9) *vortex*, 10) erlenmeyer, 11) gelas beaker, 12) gelas ukur, 13) *hot plate*, 14) inkubator, 15) jarum ose, 16) kamera digital, 17) kapas, 18) timbangan analitik, 19) kertas label, 20) lemari pendingin, 21) pH meter, 22) spatula, 23) *magnetic stirrer*, 24) tabung reaksi, 25) *rotary shaker*, 26) *mikro pipet*, 27) rak tabung reaksi, 28) baskom, 29) *Colony Counter*, 30) Masker, 31) Sarung Tangan.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu : 1) aquades steril, 2) Medium mineral, 3) medium NA (*Nutrient Agar*), 4) Medium NB (*Nutrient Broth*), 5) Isolat bakteri *B. cereus*, 6) sampel limbah SBE, 7) Spiritus, 8) Alkohol 70%, 9) Kapur Kalsit, 10) CPO (*Crude Palm Oil*), 11) *Bromthymol Blue*.

3.3. Metode Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di PT. Tunas Baru Lampung Tbk Cabang Palembang, dengan cara sampel diambil sebanyak 100 kg SBE secara sengaja pada saat proses penjernihan CPO berlangsung dan limbah SBE keluar dari cerobong pembuangan. Percobaan menggunakan RAL dengan perlakuan konsentrasi inokulan bakteri lipolitik yang terdiri dari 6 taraf yaitu :

$P_0 = 0 \text{ mL kg}^{-1}$ (sebagai kontrol)

$P_1 = 25 \text{ mL kg}^{-1}$

$P_2 = 50 \text{ mL kg}^{-1}$

$P_3 = 75 \text{ mL kg}^{-1}$

$P_4 = 100 \text{ mL kg}^{-1}$

$P_5 = 125 \text{ mL kg}^{-1}$

Setiap perlakuan diaplikasikan pada 2 kg limbah SBE, yang diulang 3 kali sehingga terdapat 18 unit percobaan.

3.4. Cara Kerja

Adapun cara kerja yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi 2 (dua) tahap pekerjaan, yaitu:

3.4.1. Persiapan

Tahap persiapan yang dilakukan yaitu :

1. Studi pustaka, dengan mengumpulkan dan mempelajari literatur yang berkaitan dengan penelitian.
2. Pengambilan sampel di PT. Tunas Baru Lampung Tbk Cabang Palembang.
3. Mempersiapkan peralatan yang akan digunakan di laboratorium.

3.4.2. Kegiatan di Laboratorium

3.4.2.1. Sterilisasi Alat dan Media

Alat yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit sedangkan untuk media disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 20 menit (Sugiyanto, 2015).

3.4.2.2. Pembuatan Medium NA

Langkah-langkah dalam pembuatan media NA yaitu NA ditimbang dengan perbandingan 20 g, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 1000 ml aquades. Erlenmeyer yang berisi larutan NA disumbat dengan kapas dan aluminium foil lalu di homogenkan dengan *magnetic stirrer* dan

dipanaskan diatas *hot plate* hingga larutan menjadi kuning jernih, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi berukuran 10 ml lalu tabung reaksi disumbat dengan kapas dan aluminium foil. Tabung reaksi yang mengandung NA disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama kurang lebih 15 menit, setelah itu didiamkan pada suhu kamar sampai media membeku pada posisi miring.

3.4.2.3. Pembuatan Medium Mineral mengandung CPO dan *Bromthymol Blue*

Langkah-langkah dalam pembuatan medium mineral yang mengandung CPO yaitu timbang K_2HPO_4 4,5g; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; NaCl 0,1g; $CaCl_2$ 0,1 g; $FeCl_3$ 0,02 g, CPO 44,3 ml, Agar 15 gram dan *Bromthymol Blue* 0,08 g, dimasukan ke dalam erlenmeyer lalu di larutkan dengan 1000 ml aquades, kemudian larutan dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirer*, lalu media disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.2.4. Pembuatan Medium NB

Langkah-langkah dalam pembuatan medium NB yaitu medium NB ditimbang dengan perbandingan 13 g, kemudian dimasukan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 1000 ml aquades, lalu dipanaskan hingga larut. Larutan *nutrient broth* di autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.2.5. Pembuatan Medium Mineral mengandung CPO

Langkah-langkah dalam pembuatan medium mineral yang mengandung CPO. Timbang K_2HPO_4 4,5g; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; NaCl 0,1g; $CaCl_2$ 0,1 g; $FeCl_3$ 0,02 g dan CPO 44,3 ml masukan ke dalam erlenmeyer lalu di larutkan dengan 1000 ml aquades, kemudian larutan dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirer*, lalu media disterilkan dengan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Modifikasi Atlas, 2010).

3.4.3. Peremajaan Bakteri Lipolitik

Cara melakukan peremajaan bakteri yaitu diambil isolat murni bakteri lipolitik *B. cereus* sebanyak 1 ose secara aseptis lalu digoreskan secara zigzag pada medium NA miring yang telah disiapkan, kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu ruang (Anisah, 2015).

3.4.4. Uji Lipolitik Bakteri *Bacillus cereus*

Langkah-langkah dalam uji lipolitik *B.cereus* yaitu dengan cara mengambil biakan hasil peremajaan bakteri sebanyak 1 ose dari medium NA miring, kemudian dimasukkan dengan cara zigzag pada media ke dalam cawan petri yang berisi medium mineral mengandung CPO dan indikator *Bromthymol Blue* (pembuatan medium mineral mengandung CPO dan *Bromthymol Blue* disajikan pada point 3.4.2.3), lalu di masukan kedalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kemudian diamati koloni yang tumbuh, dengan indikasi adanya warna kuning pada daerah yang diisolasi bakteri dengan demikian bakteri masih bersifat lipolitik.

3.4.5. Pembuatan Inokulum Bakteri Lipolitik

Adapun cara pembuatan inokulum bakteri lipolitik yaitu dengan cara mengambil biakan hasil peremajaan bakteri sebanyak 5 ose dari medium NA miring, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 1000 ml yang berisi medium NB (pembuatan medium NB disajikan pada point 3.4.2.4), lalu di *shaker* dan diinkubasi selama waktu generasi terpendek yang didapat. Perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer* dibawah mikroskop hingga kepadatan sel bakteri mencapai $\pm 10^8$ sel ml⁻¹.

3.4.6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Lipolitik

Cara pembuatan kurva pertumbuhan isolat bakteri yaitu inokulum bakteri sebanyak 4% volume/volume (v/v) di inokulasikan pada mineral medium sebanyak 100 ml (cara pembuatannya disajikan pada point 2.4.2.5), kemudian diletakan di *rotary shaker* lalu dilakukan perhitungan jumlah sel bakteri dimulai dari awal inokulasi yang kemudian dihitung kembali dengan interval 3 jam hingga

menunjukkan kepadatan sel yang menurun, perhitungannya dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Kemudian data jumlah sel isolat untuk setiap pengamatan dibuat dalam bentuk grafik, hal ini bertujuan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhannya. Dengan melihat kurva pertumbuhan isolat dapat diketahui fase pertumbuhan eksponensial yang kemudian waktu generasi pada fase eksponensial sebagai dasar pengaplikasian inokulum pada bioreaktor yang mengandung SBE. Persamaan yang digunakan untuk menentukan waktu generasi adalah:

$$G = \frac{t}{3,3 \log\left(\frac{b}{B}\right)}$$

Keterangan:

G = waktu generasi

t = selang waktu antara pengukuran jumlah sel didalam populasi pada suatu saat dalam fase log (B) dan kemudian lagi pada suatu titik waktu kemudian (b)

B = populasi awal

b = populasi setelah waktu t

log = \log_{10}

3,3 = faktor konversi \log_2 menjadi \log_{10}

(Pelczar dan Chan, 2010).

3.4.7. Pembuatan Media TPC (*Total Plating Count*)

Cara pembuatan media TPC yaitu media NA ditimbang dengan perbandingan 20 g 1000 ml⁻¹ aquades, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan di panaskan dengan *hot plate*, kemudian diamkan media NA disterilkan dengan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.8. Pembuatan Simulasi Pengaturan pH dan Kelembaban

Dalam menentukan pH dan kelembaban optimum untuk pertumbuhan bakteri perlu dilakukan simulasi atau uji coba dengan pemberian kapur dan aquades steril pada limbah SBE, langkah-langkah yang dilakukan yaitu: kapur kalsit ditimbang dan dibuat tiga ulangan dengan masing-masing perbandingan

yaitu 20 g kg⁻¹ SBE, 40 g kg⁻¹ SBE, 60 g kg⁻¹ SBE, 80 g kg⁻¹ SBE, 100 g kg⁻¹ SBE. Lalu tambahkan aquades steril dan dihomogenkan sampai kelembaban 50% pengecekan kelembaban dengan menggunakan *soil taster*. Pengukuran pH dilakukan seminggu setelah pengaplikasian dengan menggunakan pH meter. Perlakuan dengan dosis terbaik yang akan digunakan sebagai dosis anjuran dalam menentukan pH pada bioreaktor.

3.4.9. Persiapan Bioreaktor untuk Bioremediasi

Dalam proses bioremediasi disiapkan sebanyak 18 baskom sebagai bioreaktor, yang masing-masing baskom diisi dengan SBE sebanyak 2 kg, kemudian baskom yang berisi SBE dengan kondisi pH dan kelembaban yang sudah ditentukan yaitu pH 6 dan kelembaban 50%, suspensi inokulum bakteri lipolitik *B. cereus* diaplikasikan sesuai dengan perlakuan dengan cara menginokulasikan bakteri lipolitik ke dalam SBE, lalu diaduk rata dan diinkubasi selama 4 minggu.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Jumlah Sel Bakteri

Perhitungan total sel bakteri dengan metode TPC (*Total Plating Count*) (pembuatan medium TPC disajikan pada point 3.4.7), perhitungan bakteri dengan *colony counter* dilakukan dengan melakukan pengenceran SBE hasil perlakuan sebanyak minimal enam seri pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}), tiga pengenceran terakhir dimasukkan ke dalam cawan petri steril untuk tiap-tiap perlakuan, kemudian tuangkan medium NA ke dalam cawan petri, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Jumlah koloni bakteri dihitung per minggu dari minggu ke-1 sampai minggu ke-4 selama proses bioremediasi berlangsung untuk setiap perlakuan.

3.6. Analisis Data

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini yakni rancangan acak lengkap, jika hasil sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Duncan taraf 5%.