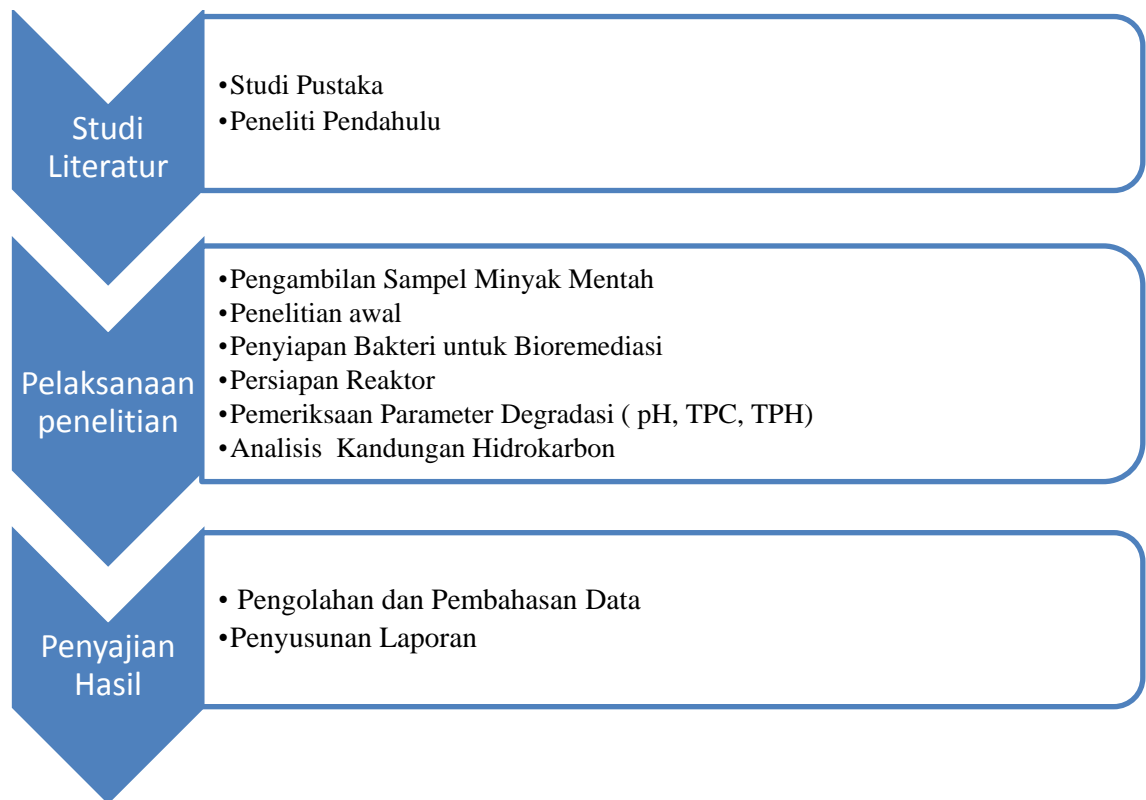


BAB III METODE PENELITIAN

1.1. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian terdapat pada diagram alir penelitian pada gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian

1.1.1. Studi literatur

Tahapan ini merupakan tahapan awal yang dilakukan sebelum memulai penelitian. Pada tahap studi literatur, penulis melakukan studi

pendahuluan agar penulis memahami dan mempelajari penelitian yang akan di uji. Studi literatur juga digunakan penulis untuk membuat batasan masalah serta hipotesis.

a. Studi pustaka

Studi pustaka yaitu tahapan pertama dimana penulis memahami dan mempelajari dasar-dasar teori tentang penelitian yang akan diteliti. Pada tahap ini, teori dan referensi didapat dari buku-buku serta sumber akademis lainnya mengenai penelitian yang akan dikerjakan.

1.1.2. Pelaksanaan Penelitian

A. Pengambilan sampel *crude oil*

Pengambilan sampel *crude oil* dilakukan di lapangan pemboran minyak milik warga Lokal Desa Talang Sungaiangit, Kecamatan Babat Toman, Kabupaten Musi Bumiasin, Provinsi Sumatera Selatan.

B. Penelitian Pendahuluan

1. Analisis sifat kimia, dan biologi sampel *crude oil*

Sebelum digunakan untuk media dalam reaktor, sampel *crude oil* dan substrat terlebih dahulu dianalisis sifat kimia dan biologinya.

a. Analisis sifat kimia

Analisis sifat kimia dilakukan terhadap sampel beberapa jenis substrat yang dipakai sebelum digunakan untuk remediasi. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Kesuburan Tanah Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

Tabel 3.1. Variabel Analisis

Variabel Analisis	Satuan	Metode
C – organic	%	Spektrofotometri

N – total		Kjeldahl
P – total	%	Spektrofotometri
K – total		Gravimetri
Kapasitas Tukar Kation (KTK)		SNI 13-3494-1994
pH	gr/cm ³	Potensiometri, SNI06-6989.11-2004
Bahan organik	%	Spektrofotometri

b. Analisis biologi

Analisis biologi dilakukan terhadap sampel tanah yang telah terkondisikan *crude oil* yang bertujuan untuk mengisolasi bakteri pendegradasi yang akan digunakan dalam penelitian. Analisis dilakukan menggunakan metode *pour plate*. Analisis dilakukan dengan mengambil 1 ml sampel yang dilarutkan dalam 9 ml akuades steril, kemudian dilakukan pengenceran hingga 10⁻⁵. Sebanyak 1 ml sampel yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Penanaman bakteri dilakukan dengan metode *pour-plate* menggunakan media NA (sebagai media umum bakteri) untuk mengetahui keberadaan bakteri heterotrof dalam sampel (Gaudy & Gaudy, 1980).

C. Persiapan Penelitian

1. Penyiapan bakteri untuk bioremediasi

Persiapan dilakukan agar bakteri yang terlibat dalam bioremediasi di setiap sel pengamatan memiliki kondisi yang sama untuk melakukan degradasi sehingga perbedaan yang terukur terjadi karena perbedaan perlakuan (variasi). Bakteri yang digunakan pada

penelitian ini adalah bakteri hasil isolasi peneliti sebelumnya dari tanah yang terkondisikan *crude oil* selama kurang lebih satu bulan. Spesies yang berbeda dalam kultur campuran dapat diurutkan berdasarkan ukuran, berat dan faktor-faktor lain atau dibagi oleh spesies dan dipindahkan ke media yang terpisah untuk menciptakan kultur murni dari satu spesies. Kemudian bakteri tersebut dipindahkan pada media cair berupa NB (*Nutrient Broth*) dan menjadi inokulum yang berisi *mix culture bacteria*. Isolat yang diinokulasikan merupakan konsorsium bakteri yang ada dalam sampel *crude oil*. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan OD (*optical density*) untuk dicari awal fase stasionernya. Fase ini adalah fase dimana jumlah sel paling banyak dan siap untuk dipindahkan ke reaktor tanah. Isolat yang digunakan yaitu NCOT 1, NCOT 2, NCOT 3, dan NCOT 4.

2. Penyiapan Reaktor dan Media Cair

Reaktor yang digunakan yaitu dengan menggunakan botol vial. Botol vial yang digunakan berukuran 100 ml. Reaktor yang disediakan sebanyak 60 botol. 12 botol pertama sebagai t0 dan sampai 12 botol terakhir sebagai t4. Botol vial di beri tutup kapas lalu disterilkan dengan cara di oven. Proses penelitian menggunakan metode duplo. Media cair yang digunakan menggunakan NB (*Nutrient Broth*). Proporsi campuran media cair dan *crude oil* ada 2 variasi yaitu 95% : 5% dan 90% : 10%. Selanjutnya 4 ml inokulum bakteri yang telah disiapkan di tahap sebelumnya ditambahkan pada masing-masing reaktor kecuali reaktor kontrol K1, dan K2

Masing-masing reaktor dibuat duplo dan terdiri dari:

1. Reaktor kontrol (K1) yaitu media cair + *crude oil* dengan proporsi (95% : 5%)

2. Reaktor kontrol (K2) yaitu media cair + glukosa + *crude oil* dengan proporsi (95% : 10% : 5%)

Reactor uji pengaruh penambahan beberapa jenis substrat dengan variasi sebagai berikut:

- a. Reactor A₁
Media cair + *crude oil* (5%) + Inokulum
- b. Reactor A₂
Media cair + *crude oil* (10%) + Inokulum
- c. Reactor B₁
Media cair + *crude oil* (5%) + substrat glukosa 10 % + Inokulum
- d. Reactor B₂
Media cair + *crude oil* (10%) + substrat glukosa 10 % + Inokulum

Tabel 3.2. Reaktor Penelitian

Kode Reaktor	Variasi Reaktor			
	Media air (berat basah)	<i>Crude Oil</i> (berat basah)	<i>Co-substart</i> (berat basah)	Inokulum
K1	76 ml	4 ml	-	-

K1 _d	76 ml	4 ml	-	-
K2	76 ml	4 ml	8 ml	-
K2 _d	76 ml	4 ml	8 ml	-
A ₁	76 ml	4 ml	-	4 ml
A _{1d}	76 ml	4 ml	-	4 ml
A ₂	72 ml	8 ml	-	4 ml
A _{2d}	72 ml	8 ml	-	4 ml
B ₁	76 ml	4 ml	8 ml	4 ml
B _{1d}	76 ml	4 ml	8 ml	4 ml
B ₂	72 ml	8 ml	8 ml	4 ml
B _{2d}	72 ml	8 ml	8 ml	4 ml

D. Pemeriksaan Parameter Degradasi

- a. Parameter degradasi yang diperiksa pada penelitian adalah Perhitungan jumlah sel bakteri (*Total Plate Count*), pH dan *Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)*. Pemeriksaan parameter degradasi dilakukan terhadap semua reaktor yang telah ditempatkan pada temperatur ruangan dan telah diaerasi dengan cara diaduk setiap hari.
- b. Pengukuran pH menggunakan metode potensiometri dengan menggunakan indikator pH. Pengujian dilakukan dengan mengacu pada SNI 06-6989.11-2004. Langkah awal yang dilakukan adalah mengambil 1 ml sampel media lalu di teteskan pada indikator pH. Selanjutnya cocokan warna sesuai indikator pH lalu didapatkan hasil pH pada sampel.
- c. Pengukuran *Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)* dengan prinsip gravimetri. Langkah awal yang dilakukan adalah menimbang berat botol vial awal sebelum dimasukkan ke oven (a_1) dan setelah disterilkan menggunakan oven selama 105°C selama 1 jam dan

desikator selama 30 menit (a_2). Langkah berikutnya adalah memasukkan variasi sampel ke dalam botol vial kemudian diekstraksi dengan menggunakan 10 ml *n-hexane* sebagai zat pengekstraksi.

Ekstraksi dilakukan di dalam botol vial menggunakan *orbital shaker* selama 30 menit. Kemudian mendinginkan sampai terjadi pemisahan media cair dengan *supernatant* (cairan yang mengandung minyak). *Supernatant* di biarkan di dalam botol lalu media cair di ambil kembali lalu menambahkan kembali 10 ml *n-hexane* untuk mengekstraksi kembali dan melakukan pengocokan kembali sampai media cair dan *supernatant* terpisah. *Supernatant* yang terpisah dimasukkan kembali kedalam botol vial.

Botol vial yang telah berisi *supernatant* kemudian dioven pada suhu 105°C selama 1 jam lalu dipindahkan ke desikator selama 30 menit. Botol vial yang telah kering kemudian ditimbang, berat botol vial tersebut akan digunakan untuk menghitung konsentrasi *oil*. Perhitungan konsentrasi penurunan TPH dilakukan dengan menggunakan persamaan sebagai berikut.

$$\text{Konsentrasi penurunan TPH (\%)} = \frac{b-a_1}{\text{grsampel}} \times 100$$

Dimana:

a_1 = berat botol vial awal sebelum dioven (gram)

b = berat botol vial berisi *supernatant* setelah dioven (gram)

Pengukuran terhadap seluruh parameter dilakukan setiap 7 hari sampai t4. Dikarenakan bila dilakukan setiap hari atau 2 hari sekali akan memerlukan dana yang cukup besar.

d. Perhitungan jumlah sel bakteri (*Total Plate Count*)

Perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan menggunakan metode *pour plate*. Langkah pertama yang dilakukan dalam perhitungan jumlah sel bakteri adalah menumbuhkan mikroba pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan melakukan pengenceran sampel terlebih dahulu.

Sampel dalam masing-masing reaktor yang diambil untuk analisis TPC adalah sebanyak 1 ml. Sampel tersebut dilarutkan dalam 9 ml aquades steril, kemudian dilakukan pengenceran sampel sampai tingkat 10^{-5} . Sebanyak 1 ml sampel hasil pengenceran, dipindahkan atau diinokulasikan ke media NA dalam cawan petri steril dengan metode *pour plate*. Masing-masing pengenceran dilakukan inokulasi sebanyak 2 kali (duplo) sehingga terdapat 24 inokulum dalam 24 cawan petri pada setiap pengujian.

Isolat yang telah dipindahkan ke medium *Nutrient Agar* selanjutnya diinkubasi, yaitu memeram mikroba pada suhu yang terkontrol agar koloni mikroba dapat tumbuh pada suhu 37°C selama 24 jam yang merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri mesofilik. Dari hasil inkubasi, mikroorganisme yang tumbuh pada setiap cawan diamati dan dihitung jumlahnya sesuai dengan kesamaan ciri morfologis.

1.2. Variabel Penelitian

Menurut Marzuki (1999), Variabel adalah hal-hal yang menjadi objek penelitian yang nilainya belum spesifik (bervariasi). Penelitian dilakukan terhadap Variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian

diamati atau diukur dampaknya (data yang akan datang). Variabel yang dapat ditentukan dalam penelitian ini adalah:

A. Variabel bebas, yaitu:

1. Perlakuan dengan proporsi media cair : *crude oil* = 19:1 (A_1), 9:1 (A_2),
2. Penambahan variasi substrat di bahan uji yang berisi media cair dan *crude oil* dengan B_0 = tanpa penambahan substrat , B_1 = 10 % Glukosa
3. Penambahan inokulum dengan C_0 = tanpa inokulum dan C_1 = 4 ml inokulum

B. Variabel terikat, yaitu:

1. pH, *TPH*, dan *TPC*(K_1)

C. Variabel kontrol

1. Menggunakan suhu ruangan 27°C
2. Tidak terkena sinar matahari langsung.
3. Dilakukan selama 28 hari.

Maka kombinasi perlakuan adalah sebagai berikut:

$A_1B_0K_1C_0$ = proporsi media cair : *crude oil* = 5% *crude oil*, dengan tidak dilakukan penambahan substrat dan inokulum, dan parameter yang diteliti adalah pH, *TPH*, dan *TPC*.

$A_2B_1K_1C_0$ = proporsi media cair : *crude oil* = 10% *crude oil*, dengan dilakukan penambahan glukosa 10% tanpa inokulum, dan parameter yang diteliti adalah pH, *TPH*, dan *TPC*.

$A_1B_0K_1C_1$ = proporsi media cair : *crude oil* = 5% *crude oil*, dengan dilakukan penambahan inokulum tanpa substrat, dan parameter yang diteliti adalah pH, *TPH*, dan *TPC*.

$A_2B_0K_1C_1$ = proporsi media cair : *crude oil* = 10% *crude oil*, dengan dilakukan penambahan inokulum tanpa substrat , dan parameter yang diteliti adalah pH, *TPH*, dan *TPC*.

$A_1B_1K_1C_1$ = proporsi media cair : *crude oil* = 5% *crude oil*, dengan dilakukan penambahan substrat serta inokulum, dan parameter yang diteliti adalah pH, *TPH*, dan *TPC*.

$A_2B_1K_1C_1$ = proporsi media cair : *crude oil* = 10% *crude oil*, dengan dilakukan penambahan substrat serta inokulum, dan parameter yang diteliti adalah pH, *TPH*, dan *TPC*.

Tabel 3.3. Kombinasi Perlakuan

Kode Reaktor	Variasi Reaktor				
	Media air (berat basah)	<i>Crude Oil</i> (berat basah)	<i>Co- substart</i> (berat basah)	Inokulum (berat basah)	Waktu
$A_1B_0K_1$	76 ml	4 ml	-	-	28 hari
$A_1B_1K_1$	76 ml	4 ml	8 ml	-	28 hari
$A_1B_2K_1$	76 ml	4 ml	-	4 ml	28 hari
$A_1B_3K_1$	72 ml	8 ml	-	4 ml	28 hari
$A_2B_0K_1$	76 ml	4 ml	8 ml	4 ml	28 hari
$A_2B_1K_1$	72 ml	8 ml	8 ml	4 ml	28 hari

3.3 Parameter Penelitian

Parameter yang akan diperiksa dalam penelitian ini adalah:

1. pH
2. *Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)*
3. Jumlah sel bakteri (*Total Plate Count*)

Pengukuran terhadap seluruh parameter dilakukan setiap 7 hari selama 28 hari.

3.4 Alat dan Bahan

a. Pengukuran Parameter pH

Alat:

1. Pipet ukur 1 ml (1 buah)
2. Karet hisap (1 buah)
3. Indikator pH

Bahan:

1. Sampel 1 ml

b. Pengukuran *Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)*

Alat:

1. Botol vial 12 buah
2. *Orbital Shaker* 1 buah
3. Gelas beker 50 ml, 16 buah
4. Pipet ukur 10 ml, 1 buah
5. Pipet ukur 50 ml, 1 buah
6. Oven 105°C
7. Desikator
8. Pipet
9. Krustang

10. Neraca analitik

Bahan:

1. Sampel dalam botol vial
2. *N-hexane* 240 ml
3. Aquades

c. Perhitungan Jumlah Sel Bakteri (*Total Plate Count*)

Alat:

1. Tabung reaksi 10 ml, 55 buah
2. Cawan petri, 24 buah
3. Inkubator 37°C
4. Pipet ukur 10 ml, 1 buah
5. Pipet ukur 1 ml, 1 buah
6. Neraca analitik

Bahan:

1. Sampel uji masing masing 1 ml Aquades steril 100 ml
2. *Nutrient Agar*
3. *Aquadest*

3.5 Metode Analisis Data

Setelah dilakukan pemeriksaan parameter maka untuk mengetahui efisiensi pengukuran *TPH* (*Total Petroleum Hydrocarbon*), Persamaan yang digunakan adalah sebagai berikut.

$$\text{Konsentrasi Total Petroleum Hydrocarbon (\%)} = \frac{c-a_2}{\text{gr sampel}} \times 100$$

Dimana: a_2 = berat botol vial kosong setelah dioven(gram)

c = berat botol vial berisi supernatant setelah dioven(gram)

