

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan September sampai bulan november 2023. Pengambilan sampel dilakukan di sekitar industri daur ulang baterai aki, Desa Bandar Khalipah, Deli Serdang. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA USU pada uji isolasi, resistensi, potensi dan karakterisasi. Laboratorium Balai Riset Dan Standardisasi Industri Medan pada uji penurunan timbal.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas ukur, gelas beaker, spatula, toples kaca, timbangan digital, *centrifuge*, erlenmeyer, tabung reaksi, autoklaf, inkubator, *incubator shaker*, *vortex mixer*, batang pengaduk, lemari pendingin, oven, LAF, pipet ukur, pipet volume, karet penghisap, cawan petri, ose, kaca preparat, kaca penutup, corong gelas, labu ukur, kertas saring, lemari asam, hotplate, spektrofotometer uv-vis, Spektrofotometri Serapan Atom (SSA), mikroskop binokuler.

##### **3.2.2 Bahan**

Tanah, media NA, media NB, media TSIA, media SIM, media SCA  $Pb(NO_3)_2$ , aquades, crystal violet, lugol, alkohol 96%, safranin,  $HNO_3$ , HCl,  $H_2O_2$  3%, kapas dan tisu, aluminium foil.

#### **3.3 Metode Penelitian**

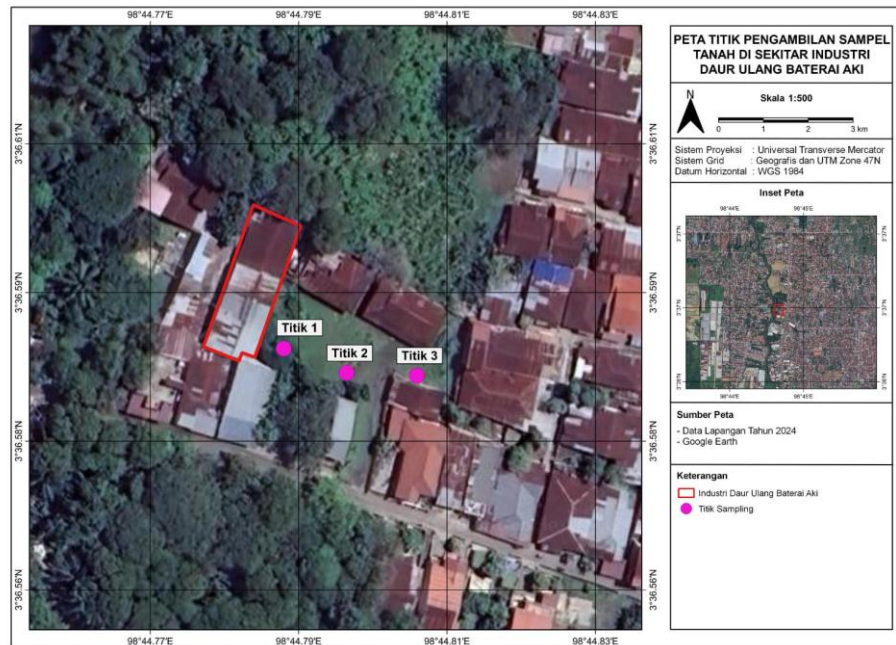
Metode penelitian ini bersifat eksperimen di laboratorium yang dirancang secara deskriptif melalui beberapa tahap penelitian yaitu, isolasi bakteri, resistensi bakteri terhadap timbal (Pb), uji potensi penurunan kadar timbal oleh bakteri dan karakterisasi bakteri yang berpotensi menurunkan kadar timbal (Pb)

#### **3.4 Prosedur Penelitian**

##### **3.4.1 Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil tanah dari tiga titik di sekitar industri daur ulang baterai aki kemudian dihomogenkan. Tanah yang akan diambil dibersihkan terlebih dahulu dari ranting, daun atau sampah. Kemudian

tanah diambil dengan menggunakan sendok atau spatula yang sudah disterilkan dan dimasukkan kedalam toples kaca steril dan diberi label.



**Gambar 3. 1** Peta titik pengambilan sampel tanah

### 3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum melakukan penelitian, seluruh alat dan bahan yang akan digunakan harus dalam keadaan steril. Alat dan bahan yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan alat sterilisasi. Alat yang berbahan dasar kaca akan dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas. Bahan atau media yang akan digunakan ditutup menggunakan kapas atau aluminium foil lalu dibungkus lagi menggunakan kapas. Setelah itu bahan atau alat tersebut dimasukkan kedalam autoklaf untuk disteriliasi selama 15 menit dengan suhu 121°C.

### 3.4.3 Pembuatan Larutan Stock $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1000mg/l

Larutan stock  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  1000mg/l dilakukan dengan melarutkan 1000 mg  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  kedalam 1 liter aquades. Sehingga didapatkan larutan stock dengan konsentrasi  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  1000mg/l.

### **3.4.4 Isolasi Bakteri**

Isolasi bakteri diawali dengan melakukan pengenceran bertingkat pada sampel tanah. Sampel tanah ditimbang sebanyak 1 gr dan dimasukkan kedalam 9 ml NaCl kemudian dihomogenkan untuk mendapatkan pengenceran tingkat pertama ( $10^{-1}$ ). Pengenceran dilakukan secara bertingkat dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$  dengan mengocok hasil setiap tahap pengenceran dengan menggunakan vortex. Kultur hasil tingkat pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  kemudian diambil sebanyak 0,1 ml dengan menggunakan mikropipet untuk diisolasikan pada media NA yang sudah disiapkan dalam cawan petri. Selanjutnya digunakan batang pengaduk L untuk meratakan larutan pada media NA. Inkubasi cawan petri pada posisi terbalik dalam inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama  $2 \times 24$  jam. Koloni yang telah tumbuh kemudian diinokulasikan pada media selektif  $\text{NA} + \text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  100 ppm untuk menyeleksi dan pemurnian isolat yang resisten terhadap timbal. Isolat yang dapat tumbuh pada media selektif akan dilanjutkan pada uji resistensi.

### **3.4.5 Karakterisasi Bakteri**

#### **3.4.5.1 Pewarnaan Gram**

Warna gram dan bentuk sel bakteri dapat diketahui dengan melakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan pada isolat bakteri yang telah dimurnikan. Satu ose isolat bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose lalu dihomogenkan dengan aquades diatas kaca objek. Selanjutnya dilakukan fiksasi dengan cara melewati kaca objek diatas api bunsen sampai kering. Kemudian ditetaskan larutan crystal violet di atas kaca preparat yang sudah difiksasi dan didiamkan sampai satu menit lalu bilas dengan aquades dan preparat dikeringanginkan. Setelah itu ditetaskan larutan lugol dan didiamkan selama satu menit kemudian dibilas dengan aquades kemudian dikeringanginkan. Berikutnya adalah proses dekolorisasi dengan cara meneteskan larutan alkohol 96% setetes demi setetes sampai alkohol terlihat jernih lalu bilas dengan aquades dan dikeringanginkan. Tahapan terakhir, tetaskan pewarna safranin di atas preparat dan tunggu sampai satu menit kemudian bilas dengan aquades dan dikeringanginkan. Preparat yang selanjutnya diamati dengan menggunakan

mikroskop dengan perbesaran 100x, namun teteskan minyak imersi terlebih dahulu (Suryatini & Rai, 2018).

### **3.4.5.2 Uji Biokimia**

#### **a. Uji katalase**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Isolat bakteri yang telah tumbuh, diosekan pada kaca objek steril di dalam *laminar air flow*, lalu ditetaskan dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% sebanyak 2-3 tetes. Terbentuknya gelembung disekitar koloni bakteri menandakan hasil positif

#### **b. Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)**

Uji ini dilakukan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan dalam memecahkan dextrose, laktosa, sukrosa dan pembebasan sulfida. Uji TSIA akan menunjukkan bakteri menghasilkan gas, H<sub>2</sub>S atau tidak. Isolat bakteri diambil menggunakan ose lalu ditusukkan pada media TSIA sampai sepertiga dasar tabung lalu diangkat dan digores secara zig-zag pada permukaan media. Kemudian media diinkubasi selama 2×24 jam pada suhu 37°C lalu diamati perubahannya.

#### **c. Uji SIM**

Uji ini dilakukan untuk melihat motilitas pada bakteri. Inokulasikan isolat bakteri dengan cara mengambil isolat murni menggunakan ose lalu ditusukkan pada media SIM. Kemudian media diinkubasi selama 2×24 jam pada suhu 37°C dan amati pertumbuhan bakterinya. Pertumbuhan bakteri menyebar menjauhi garis inokulasi sehingga media tampak keruh menunjukkan bakteri bersifat motil dan apabila pertumbuhan bakteri hanya pada garis inokulasi menunjukkan bakteri tidak motil. Untuk uji indol, isolat ditambahkan senyawa kovacs. Perubahan warna pada permukaan media menjadi merah menunjukkan hasil positif.

#### **d. Uji SCA**

Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon tunggal dan energi. Isolat bakteri diinokulasikan dengan metode goresan zig-zag pada bagian miring dan ditusukkan sampai bagian dasar media miring SCA. Selanjutnya media akan diinkubasi dengan suhu 28°C selama 18-24 jam. Lalu diamati perubahan warna pada media, hasil tanda positif akan menunjukkan perubahan warna menjadi biru.

#### **3.4.6 Uji Resistensi Bakteri terhadap timbal (Pb)**

Setelah didapatkan isolat murni pada tahap sebelumnya, selanjutnya akan dilakukan uji resistensi isolat dengan menggunakan media NB yang diperkaya dengan  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Konsentrasi  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  yang digunakan adalah 100 ppm dengan pengulangan dua kali. Kultur selanjutnya akan diinkubasi selama 24 jam dengan kecepatan 220 rpm dengan menggunakan *incubator shaker*, untuk mengetahui ketahanan bakteri terhadap timbal. Selanjutnya akan dilakukan uji *Optical Density* (OD) pada setiap perlakuan untuk melihat kepadatan bakteri menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Tingkat resistensi isolat bakteri terhadap timbal diketahui dengan mengukur kekeruhan media dengan menggunakan spektrofotometer yaitu pertumbuhan bakteri melalui penentuan massa sel dengan *Optical Density* (OD). Semakin tinggi nilai absorbansi media pada uji *Optical Density* (OD) menunjukkan semakin tinggi pertumbuhan bakteri. Setelah didapatkan beberapa isolat dengan tingkat resisten terhadap logam yang berbeda berdasarkan tingkat kepadatan, selanjutnya dilakukan tahapan uji penurunan.

#### **3.4.7 Uji Potensi Bakteri terhadap Penurunan Kadar Timbal (Pb)**

Uji potensi bakteri dilakukan dengan menggunakan media NB yang diperkaya timbal dengan konsentrasi 100 ppm menggunakan cemaran timbal  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  dengan pengulangan sebanyak dua kali. Bakteri diinokulasikan sebanyak satu ose pada media yang sudah disiapkan. Kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* selama 24 jam pada suhu 37°C. Media yang telah diinkubasi selanjutnya akan disentrifugasi menggunakan centrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit untuk memisahkan koloni bakteri dengan media yang mengandung timbal

nitrat. Cairan ini selanjutnya akan diukur konsentrasi timbalnya dengan menggunakan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA). Konsentrasi timbal (Pb) yang terdapat pada cairan supernatan adalah kandungan dari  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  yang tidak mampu diturunkan oleh isolat bakteri. Sehingga akan ada perbedaan antara konsentrasi awal dari timbal (Pb) dengan konsentrasi akhir yang telah mengalami penurunan. Jumlah penurunan kandungan timbal (Pb) dapat dihitung dengan :

$$R = K_o - K_a \text{ (mg/L)}$$

$$E = \frac{R}{K_a} \times 100\%$$

Keterangan :

R = konsentrasi logam timbal (Pb) yang turun;  $K_o$  = konsentrasi awal;  $K_a$  = konsentrasi akhir; E = efisiensi isolat bakteri terhadap penurunan kadar timbal.

#### 3.4.8 Analisis Penelitian

Analisis data yang didapatkan di laboratorium akan disajikan secara deskriptif kualitatif dengan melampirkan gambar isolat bakteri yang didapat dan dalam bentuk tabel pada hasil uji makroskopis, uji pewarnaan dan uji biokimia. Data juga akan disajikan dalam bentuk tabel pengamatan pada hasil uji resistensi. Analisis data potensi penurunan kadar timbal akan dihitung dengan menggunakan rumus sehingga bisa diketahui kadar penurunan timbal serta efisiensi penurunan timbal isolat bakteri.