

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas 5 perlakuan dengan 3 ulangan yang terdiri dari:

1. 0 ppm: perbandingan media LB (Luria Bertani) murni dan media Pb induk  
0:100
2. 5 ppm: perbandingan media LB (Luria Bertani) murni dan media Pb induk  
5: 95
3. 10 ppm: perbandingan media LB (Luria Bertani) murni dan media Pb induk  
10: 90
4. 15 ppm: perbandingan media LB (Luria Bertani) murni dan media Pb induk  
15: 85
5. 20 ppm: perbandingan media LB (Luria Bertani) murni dan media Pb induk  
20: 80

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel Bebas: Timbal pada konsentrasi 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm
2. Variabel Terikat: pengaruh logam berat timbal terhadap pertumbuhan bakteri *Enterobacter agglomerans* dan daya serapnya
3. Variabel Terkendali: suhu inkubasi, waktu, pH dan media.

### 3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-Agustus 2013 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.4 Alat dan Bahan

#### 3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan meliputi tabung reaksi, jarum ose, cawan petri, botol flavon, spektrofotometer, mikropipet, tip, gelas ukur, labu erlenmeyer, hand sprayer, lemari pendingin, timbangan analitik, vortex, inkubator, LAF (*Laminar Air Flow*), sentrifuge, *rotary shaking incubator*, *autoclave*, dan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*).

#### 3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nutrisi agar, *Enterobacter agglomerans*, alkohol 96%, spirtus, media Luria Bertani (yang dibuat dari 10 gr pepton, 5 gr yeast ekstrak, dan 5 gr NaCl untuk 1000 ml aquades). Untuk media agar luria bertani ditambahkan agar 20 gr untuk 1000 ml aquades), timbal asetat ( $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ), aquades, kapas, aluminium foil, plastik wrap, dan kertas label.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan**

Alat dan bahan yang akan digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu, cara kerja ini terbagi atas dua jenis sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Untuk sterilisasi basah adalah dengan cara membungkus seluruh alat dan bahan dengan kantong plastic dan menutupnya dengan rapat agar air maupun udara yang diduga membawa bakteri yang tidak diharapkan kehadirannya agar tidak dapat masuk ke dalam plastik, sedangkan jika sterilisasi kering adalah dengan tidak memasukkannya ke dalam kantong plastik. Setelah itu bahan yang telah dibungkus tersebut dimasukkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 15 psi (per square inchi) selama 15 menit.

#### **3.5.2 Pembuatan Media Luria Bertani (LB) (Kurniasari, 2005)**

1. Dilarutkan 10 gr pepton, 5 gr yeast ekstrak, dan 5 gr NaCl dalam 1000 ml aquades untuk media luria bertani broth dan ditambahkan 20 gr agar untuk media luria bertani agar.
2. Dipanaskan dan diaduk hingga larutan homogen dan mendidih.
3. Dimasukkan media kedalam beaker glass sebanyak 100 ml dan ditambahkan timbal asetat ( $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) sebanyak 0,157 gram untuk mendapatkan media Pb induk yang mengandung Pb 100 ppm.
4. Dibuat media yang mengandung Pb 0, 5, 10, 15 dan 20 ppm dengan perbandingan LB murni dan media Pb induk 0:100; 5:95; 10:90; 15:85; 20:80.

5. Dimasukkan masing-masing media yang sudah mengandung Pb kedalam botol flavon sebanyak 20 ml dengan ulangan sebanyak 3 kali.
6. Disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

### **3.5.3 Pembuatan Inokulum Bakteri (Yani dan Kurniasari, 2008)**

1. Diinokulasikan biakan murni bakteri *Enterobacter agglomerans* sebanyak 1 ose kedalam 30 ml media LB cair yang tidak mengandung Pb selama 24 jam.
2. Dilihat kekeruhannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

### **3.5.4 Pembuatan Kurva Standar Pertumbuhan Bakteri (Awwalurrizki dan Surya, 2008)**

1. Bakteri yang sudah ditumbuhkan di inokulasikan ke dalam media LB murni dengan perbandingan 1:9; 2:8; dan 3:7 dan dilihat nilai *Optical Density* (OD)-nya.
2. Setiap perbandingan di encerkan pada akuades steril dan di vortex.
3. Dilakukan pengenceran sebanyak 8 kali.
4. Pada pengenceran terakhir, diambil 1 ml bakteri masing-masing perbandingan dan ditumbuhkan pada media LB padat selama 24 jam.
5. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan *Total Plate Counter* (TPC).

6. Diregresikan antara jumlah sel yang didapat dari metode hitung cawan dengan hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer kedalam persamaan garis kurva standar  $y = ax + b$ , dimana  $y$  = jumlah sel, dan  $x$  = besarnya nilai absorbansi.

### **3.5.5 Pengaruh Logam Berat Timbal (Pb) Terhadap Pertumbuhan *Enterobacter agglomerans* (Kurniasari, 2005).**

1. Diinokulasikan inokulum *Enterobacter agglomerans* dari starter sebanyak 5% (v/v) kedalam medi LB yang mengandung konsentrasi timbal 0, 5, 10, 15 dan 20 ppm pada pH 6 dengan ulangan sebanyak 3 kali.
2. Diinkubasi pada *rotary shaker inkubator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar.
3. Diukur kerapatan optisnya setiap 4 jam sekali selama 28 jam.

### **3.5.6 Penentuan Kadar Logam Berat Timbal Yang Terserap Oleh *Enterobacter agglomerans* (Husain dan Irna, 2005).**

Pengujian penyerapan logam berat Pb oleh bakteri *Enterobacter agglomerans* dengan menggunakan AAS (*atomic absorption spectrophotometry*) diambil dari pertumbuhan bakteri yang paling tinggi dalam media yang bercampurkan logam berat Pb. Isolat *E. agglomerans* diinokulasi sebanyak 1 ml di dalam 20 ml media tersebut. Kultur *E. agglomerans* diinkubasi pada *rotary shaking inkubator* suhu 28°C dengan kecepatan 120 rpm. Kemudian kultur disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan untuk diukur konsentrasi

logam beratnya dengan menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrofometry* (AAS). Langkah kerja untuk preparasi sampel analisa Pb dengan AAS sebagai berikut:

1. Dipipet 10 ml sampel (media LB+Pb) supernatant.
2. Dimasukkan kedalam Erlenmeyer 100 ml.
3. Ditambahkan 10 ml asam nitrat pekat 65% (HNO<sub>3</sub>65%) dan dikocok.
4. Ditambahkan akuabides sebanyak 30 l dikocok.
5. Didestruksi dan dipanaskan menggunakan hotplate hingga sisa volume separuh dari volume awal.
6. Disaring menggunakan kertas saring.
7. Dianalisis filtrate dengan AAS pada panjang gelombang 270 nm.
8. Dilakukan proses pengenceran apabila konsentrasi sampel yang diperoleh lebih besar dari konsentrasi standar.

### **3.6 Analisa Data**

#### **3.6.1 Kurva Standar Pertumbuhan**

##### **1. Persamaan Korelasi**

Analisis data dengan korelasi menggunakan program SPSS 16

Hipotesis yang diuji:

$H_0$  = Tidak ada hubungan antara nilai pertumbuhan metode OD dan nilai pertumbuhan metode TPC.

$H_1$  = Ada hubungan antara nilai pertumbuhan metode OD dan nilai pertumbuhan metode TPC.

Apabila signifikansi  $< 0,05$  maka  $H_1$  diterima dan apabila signifikansi  $> 0,05$  maka  $H_0$  ditolak.

Uji korelasi pada kedua variabel, yang bertujuan untuk melihat kekuatan hubungan linear yang terjadi antara kedua variabelnya, dengan menggunakan koefisien korelasi ( $r$ ). koefisien korelasi berkisar antara +1 sampai -1, jika;

(+) Maka nilai OD dan TPC mempunyai hubungan searah, jika variabel OD ( $x$ ) tinggi maka variabel TPC ( $y$ ) tinggi pula.

(-) Maka nilai OD dan TPC mempunyai hubungan yang terbalik.

Selanjutnya penyebab perubahan variabel  $y$  yang berasal dari variabel  $x$ , apabila koefisien korelasi dikuadratkan ( $R^2$ ), sehingga dapat menjelaskan besarnya pengaruh  $x$  terhadap naik turunnya variabel  $y$ .

## 2. Persamaan Regresi

Regresi linear sederhana menggunakan persamaan  $y = ax + b$  Dimana (Awwalurizki dan Surya, 2008);

1. ( $b$ ) merupakan koefisien regresi (juga menyatakan kemiringan atau *slop*)
2. ( $a$ ) merupakan tetapan regresi dan juga disebut interensip.
3. ( $y$ ) nilai TPC dan ( $x$ ) nilai OD.

### 3.6.2 Penentuan Kandungan Logam Berat Timbal (Pb)

Penentuan kandungan logam berat Pb dalam media, menggunakan suspensi bakteri yang memiliki pertumbuhan yang optimal. Penentuan persentase logam berat Pb dengan menghitung daya reduksi (DR) sesuai persamaan (Husain dan Irna, 2005):

$$DR = \frac{C(a) - C(b)}{C(a)} \times 100\%$$

Keterangan: DR = Daya reduksi

C(a) = Konsentrasi awal Pb (ppm)

C(b) = Konsentrasi akhir Pb (ppm)

