

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi Penelitian

Rangkaian penelitian dilakukan di Laboratorium Air Tanah Jurusan Teknik Pengairan dan Laboratorium Mekanika Tanah Jurusan Teknik Sipil Universitas Brawijaya, Malang serta pengujian SEM dilakukan di Laboratorium Sentral Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang.

3.2. Peralatan dan Bahan

Pada penelitian ini, peralatan dan bahan yang digunakan, yakni :

➤ Bahan

a. Mikroorganisme konsentrasi 10^9 x CFU

Koloni mikroorganisme dipilih yang bersifat *fakultatif anaerobic*, sehingga diharapkan lebih fleksibel dalam menghadapi perubahan kondisi, yaitu diantaranya :

1. *Lactobacillus sakei*
2. *Nitrobacter sp*
3. *Pseudomonas sp*
4. *Agrobacterium tumifaciens*
5. *Bacillus subtilis*



Gambar 3.1. Mikrobakteri
Sumber: Dokumentasi Penelitian

Koloni-koloni mikroorganisme tersebut didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

b. Media pertumbuhan bakteri

Penelitian ini menggunakan media pertumbuhan yang paling sesuai dengan jenis bakteri. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah jenis media dasar, dimana media tersebut mengandung protein, karbohidrat dan garam yang cukup sehingga pertumbuhan mikroorganisme dapat optimal. Dalam penelitian ini dipakai media pertumbuhan yaitu :

- CaCl_2 ,
- MgSO_4 ,
- K_2HPO_4 , dan
- sukrose

Media pertumbuhan cair dapat dilihat pada Gambar 3.2. sebagai berikut.



Gambar 3.2. Media Pertumbuhan Bakteri
Sumber: Dokumentasi Penelitian

➤ Peralatan-peralatan yang digunakan dalam penelitian yakni :

- | | |
|--|------------------------|
| a. <i>Constant head permeameter</i> | k. Penyemprot |
| b. <i>Scanning Electron Microscope</i> | l. Neraca |
| c. <i>Micropipet P200</i> | m. Ayakan |
| d. <i>Centrifuge</i> | n. Oven |
| e. Ember Penyimpanan | o. <i>Polybag</i> |
| f. Gelas Ukur | p. <i>Stopwatch</i> |
| g. Cincin <i>direct shear</i> | q. Penggaris |
| h. Mesin <i>direct shear</i> | r. Bak |
| i. Cawan | s. Sarung tangan karet |
| j. Karet | t. Plasti |

3.3. Material

Penelitian ini didasarkan pada eksperimen di laboratorium dan dilakukan dengan cara membuat serangkaian benda uji dari material berjenis pasir sungai. Pasir sungai yang digunakan sebagai objek studi diperoleh melalui pengerukan pada anak Sungai Brantas yang berada di Wilayah Kota Batu, Jawa Timur.

3.4. Tahapan Penelitian

Dalam penelitian ini, dibagi menjadi beberapa tahapan, tahapan-tahapan tersebut dijelaskan sebagai berikut :

1. Persiapan

Pada tahapan persiapan ini, sampel tanah yang ada dianalisa dengan beberapa uji, yakni:

- a. Distribusi butiran tanah
- b. Berat jenis tanah, dan
- c. Kadar air

Hasil dari uji nantinya akan menjadi kontrol yang bersifat sebagai pembanding pada sampel tanah yang nantinya akan diinokulasikan dengan mikroorganismenya.

2. Proses pembuatan media pertumbuhan dan perkembangan bakteri

Media perkembangan bakteri dibuat dengan tahapan-tahapan berikut:

- a. Siapkan alat dan bahan, seperti: pemanas, labu ukur 5 buah, label nama, *aluminium foil*, biang bakteri (setiap jenis @25ml), air mineral murni 1 liter; CaCl_2 0,25 gram; MgSO_4 0,25 gram; K_2HPO_4 2,5 gram; Sukrosa 25 gram.
- b. Campur air mineral murni dengan CaCl_2 , MgSO_4 , K_2HPO_4 , sukrosa. Aduk hingga rata.
- c. Hasil campuran dibagi dan dimasukkan ke dalam 5 buah labu ukur. Masing-masing labu ukur berisi 200 ml.
- d. Tutup labu dengan *aluminium foil*.
- e. Panaskan di pemanas selama ± 1 jam.
- f. Setelah dipanaskan, keluarkan labu dari pemanas. Tunggu hingga labu dingin dengan sendirinya.
- g. Setelah labu benar-benar dingin, masukkan biang bakteri. Beri label nama setiap labu untuk setiap jenis bakteri.
- h. Taruh labu pada tempat yang tidak terlalu banyak terkena sinar cahaya matahari. Tempatkan pada suhu ruangan, dan tunggu hingga beberapa hari.

Gambar-gambar proses pembuatan media dapat dilihat pada Gambar 3.3.-Gambar 3.7. berikut



Gambar 3.3. Biang bakteri
Sumber: Dokumentasi Penelitian



Gambar 3.4. Pengambilan biang bakteri
Sumber: Dokumentasi Penelitian



Gambar 3.5. Pembuatan media bakteri sebelum labu dipanaskan
Sumber: Dokumentasi Penelitian



Gambar 3.6. Pembuatan media bakteri penyimpanan selama beberapa hari
Sumber: Dokumentasi Penelitian



Gambar 3.7. Pembuatan media bakteri setelah didiamkan selama beberapa hari
Sumber: Dokumentasi Penelitian

3. Inokulasi bakteri

- a) Dalam proses inokulasi bakteri maka pasir yang digunakan dalam penelitian ini adalah pasir yang lolos saringan 2 mm yaitu saringan no.10. Proses pengayakan dapat dilihat pada Gambar 3.8. berikut.



Gambar 3.8. Pengayakan sampel tanah
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- b) Kemudian tanah yang lolos saringan no.10 tadi akan dioven untuk sterilisasi agar bakteri yang ada dalam tanah tersebut mati dan tidak mengganggu perkembangan bakteri yang akan diinokulasi. Proses pengovenan dapat dilihat pada Gambar 3.9. berikut



Gambar 3.9. Pengovenan sampel tanah
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- c) Selanjutnya sampel tanah yang telah dioven didiamkan terlebih dahulu dalam suhu ruangan selama beberapa waktu hingga suhunya turun. Sampel tanah kemudian dibagi menjadi 6 bagian masing – masing seberat 2500 gram dalam plastik *polybag*. 5 bagian tanah akan diinokulasikan dengan 5 macam mikrobakteri yang berbeda sedang 1 bagian sebagai kontrol.



Gambar 3.10. Penimbangan berat sampel
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- d) Siapkan bakteri yang akan diinokulasikan pada sampel pasir, bakteri dapat ditempatkan pada tabung tertutup untuk menghindari bersinggungan dengan udara luar. Gambar bakteri dalam tabung dapat dilihat pada Gambar 3.11. sebagai berikut.



Gambar 3.11. Bakteri dalam tabung
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- e) Pasir yang telah dibagi menjadi 6 bagian tadi kemudian dicampurkan dengan media pertumbuhan bakteri. Selanjutnya, ke dalam campuran pasir dan media pertumbuhan tadi diinokulasikan mikroorganisme sejumlah 25 ml dengan konsentrasi 10^9 x CFU. Proses pemindahan bakteri dari tabung digunakan pipet untuk menjaga tetap steril. Proses pemindahan bakteri dapat dilihat pada Gambar 3.12. seperti di bawah.



Gambar 3.12. Pemindahan bakteri
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- f) Sampel tanah dalam *polybag* yang sudah tercampur dengan media pertumbuhan bakteri kemudian diinokulasikan dengan koloni mikrobakteri sejumlah 25 ml dengan konsentrasi 10^9 x CFU kemudian ditutup rapat dengan karet gelang setelah itu untuk menghindari kesalahan maka diberi label nama bakteri yang diinokulasikan pada sampel pasir tersebut. Gambar sampel yang telah diberi label dapat dilihat pada Gambar 3.13. berikut



Gambar 3.13. Plastik *polybag* ditutup dan diberi label
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- g) Sampel tanah dibiarkan selama kurang lebih 30 hari dalam suhu ruangan serta dijaga kelembapannya dengan membasahi sampel tersebut dalam jangka waktu tertentu. Untuk menjaga tetap steril maka ditempatkan pada ember tertutup seperti pada Gambar 3.14. berikut



Gambar 3.14. Penyimpanan sampel inokulasi
Sumber: Dokumentasi Penelitian

4. Analisa permeabilitas, kuat geser tanah dan uji SEM

Sampel tanah yang telah diinokulasi dengan bakteri dan sampel tanah kontrol diuji nilai permeabilitasnya dengan menggunakan *constan head permeameter*. Langkah-langkah pengujian permeabilitas adalah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan tanah dan peralatan yang digunakan yakni *constant head permeameter*.

- b. Tanah dimasukkan ke dalam *constant head permeameter*, pada setiap ketinggian 3 cm dilakukan pemadatan ringan, dengan beberapa kali tekanan yang tidak begitu kuat hingga dirasa cukup padat seperti Gambar 3.15. berikut



Gambar 3.15. Memasukkan sampel
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- c. Pengukuran ketinggian tanah, tinggi tekan, diameter tanah. Gambar pengukuran diameter tanah dapat dilihat pada Gambar 3.16. sebagai berikut.



Gambar 3.16. Pengukuran tinggi sampel
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- d. Selanjutnya penjenjuran tanah dilakukan dengan cara memberi air melalui bagian bawah tanah tersebut hingga air naik sampai tanah bagian atas, selanjutnya didiamkan beberapa saat kemudian air dibuang kembali melalui kran bagian bawah. Dalam proses penjenjuran susunan alat diatur sedemikian rupa, yakni pipa 1 terhubung pada kran air, pipa 2 pada saluran pembuangan dan pipa 3 dihubungkan pada kran bawah *constan head permeameter*. Penjenjuran dapat dilihat pada Gambar 3.17. sebagai berikut.



Gambar 3.17. Penjenuhan
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- e. Setelah tanah jenuh, kemudian dilanjutkan dengan pengujian permeabilitas tanah. Pada tahap ini tanah yang telah jenuh akan diliri air melalui kran bagian atas *constant head permeameter*. Untuk itu pipa diatur kembali susunannya, yakni pipa 1 menjadi saluran pembuangan, pipa 2 pada kran air dan pipa 3 dihubungkan pada kran atas *constant head permeameter*. Pengujian permeabilitas dapat dilihat pada Gambar 3.18. sebagai berikut



Gambar 3.18. Pengujian permeabilitas
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- f. Setelah pengaturan pipa selesai maka kran dihidupkan, selanjutnya apabila air telah mengalir melalui saluran pembuangan maka kran bagian atas dibuka sehingga air mengalir ke *constant head permeameter*.
- g. Setelah air mengalir dari kran bagian atas maka tunggu hingga ketinggian air yang berada di atas tanah dan air yang keluar dari kran bawah stabil, setelah dirasa stabil barulah dilakukan pengukuran pada volume air yang keluar dari kran

bawah. Pengukuran volume air yang keluar dapat dilihat pada Gambar 3.19. sebagai berikut.



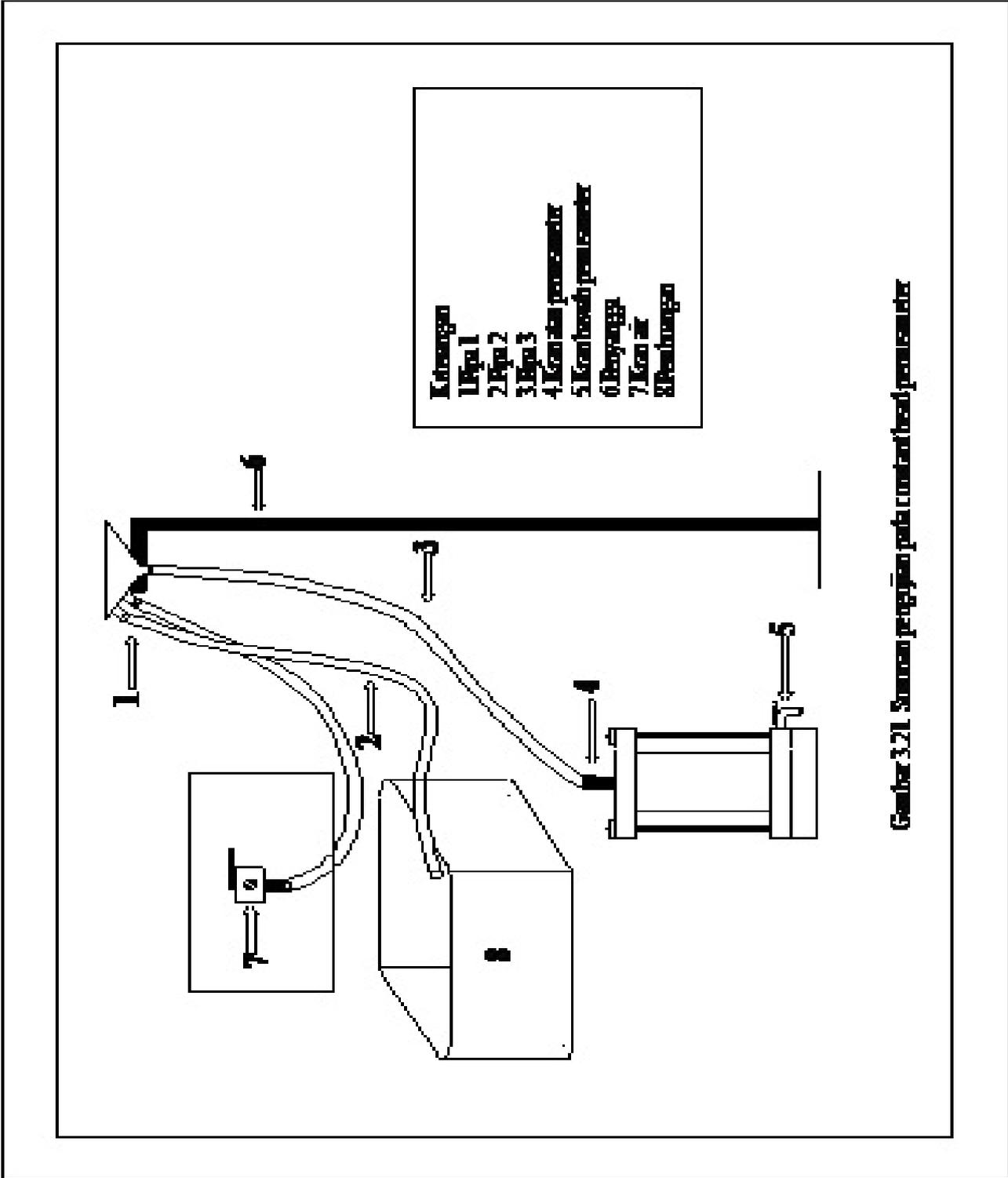
Gambar 3.19. Pengukuran permeabilitas
Sumber: Dokumentasi Penelitian

- h. Kran bagian bawah selalu dibuka, apabila air yang keluar sudah dirasa stabil maka lakukan pengukuran debit, gunakan *stopwatch* untuk mengukur lamanya pengukuran debit yaitu selama 60 detik. Catat hasil debit yang ada dalam gelas ukur.



Gambar 3.20. Hasil pengukuran
Sumber: Dokumentasi Penelitian

Susunan alat *constant head permeameter* dapat dilihat pada gambar 3.21.



Gambar 3.21. Skema pengujian pada kondisi geser pembebanan

Disamping pengujian terhadap permeabilitas, tanah hasil inokulasi bakteri juga diuji kuat gesernya dengan pengujian *direct shear*. Berikut langkah-langkah pengujian *direct shear* :

- a. Siapkan peralatan pengujian *direct shear* serta tanah yang akan diuji.
- b. Cetak tanah dengan *ring*, pastikan tanah yang dicetak sesuai dengan berat isi, memenuhi cetakan, rata dan tidak ada lubang.
- c. Masukkan ke dalam cincin pemeriksaan.
- d. Cincin pemeriksaan tadi dipasang pada mesin .
- e. Pasang beban 0,4 kg.
- f. Fokuskan nivo pada mesin, kemudian setelah fokus putar alat hingga jarum pada keduanya bergerak.
- g. Setelah jarum bergerak maka hentikan pemutaran dan arahkan kedua jarumnya hingga menunjukkan angka 0.
- h. Setelah itu hidupkan mesin, pembacaan *dial reading* dilakukan setiap 25 detik.
- i. Lakukan hingga angka *dial reading* menunjukkan 5 angka yang sama berturut-turut.
- j. Setelah selesai lakukan langkah-langkah tadi dengan beban 0,8 kg dan 1,2 kg.

Untuk mengetahui potensi mikroorganismenya dalam mengisi pori tanah, sampel tanah dianalisa dengan menggunakan *scanning electron microscopy*. Langkah pengujian *scanning electron microscopy* adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan sampel tanah yang akan diuji.
- b. Ambil sampel kemudian ditempatkan pada preparat.
- c. Sampel tanah yang diuji dilapisi dengan lapisan logam tertentu.
- d. Setelah letakkan preparat dan sampel tanah tersebut pada mikroskop.
- e. Pengaturan mikroskop dikendalikan oleh komputer. Pada komputer akan muncul gambar sampel yang ada pada mikroskop tadi.
- f. Setelah muncul gambar sampel dilakukan perbesaran hingga beberapa ribu kali objek, maka kemudian dicari gambar yang diinginkan, setelah didapat gambar yang diinginkan maka gambar dapat didokumentasikan.

Tabulasi dari tahapan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1 berikut

Tabel 3.1 Tahapan Penelitian

1. Persiapan

Pada tahadapan persiapan ini, sampel tanah yang ada dianalisa dengan beberapa uji, yakni:

a. Distribusi butiran tanah

b. Berat jenis tanah

c. Kadar air

2. Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

a. Sampel tanah yang diperoleh diayak terlebih dahulu dengan ayakan 2 mm.

b. Tanah yang lolos ayakan 2 mm kemudian dioven kurang lebih 1 jam dalam suhu 100° C

c. Kemudian siapkan bahan-bahan yang digunakan untuk ditambahkan ke dalam tanah sebagai campuran untuk membuat media bakteri. Bahan-bahan yang digunakan diantaranya 0,25 gr CaCl₂, 0,25 gr MgSO₄, 2,5 gr K₂HPO₄, dan 25 gr sukrose pada setiap 2500 gr. Masing-masing 5 bagian tanah yang akan diinokulasi bakteri dicampur dengan media pertumbuhan mikroorganisme hingga rata dan didiamkan kurang lebih 1 jam, dan media siap digunakan.

3. Inokulasi Bakteri

a. Setelah media siap digunakan, masing-masing sampel tanah yang sudah tercampur dengan media pertumbuhan kemudian diinokulasikan dengan koloni mikroorganisme sejumlah 25 ml konsentrasi 10⁹ x CFU, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 30 hari dalam suhu ruangan.

b. Sampel tanah dijaga kelembapannya dengan membasahi sampel tersebut dalam jangka waktu tertentu.

4. Analisa Permeabilitas, Kuat Geser dan Uji SEM

Sampel tanah yang telah diinokulasi dengan bakteri dan sampel tanah kontrol dibagi menjadi beberapa bagian. Sampel tersebut sebagian diuji nilai permeabilitas dengan uji *constan head*. Bagian lainnya diuji kadar airnya dengan pengujian *water content*. Bagian selanjutnya diuji kuat gesernya dengan uji *direct shear*. Selanjutnya berdasarkan hasil uji permeabilitas dan kuat geser akan didapat sampel-sampel dengan angka permeabilitas terendah dan kuat geser tertinggi kemudian pada sampel tersebut akan dilakukan uji SEM untuk mengetahui perkembangan dari mikrobakteri penghasil *ekstraseluler polisakarida*.

3.5. Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini, langkah awal yang perlu dilakukan yaitu menyiapkan bahan dan peralatan yang dibutuhkan. Bahan yang digunakan berupa serangkaian benda uji dari material berjenis pasir sungai dengan menggunakan 5 jenis mikrobakteri yang akan diinokulasikan, yakni

Lactobacillus sakei, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas sp* dan *Nitrobacter sp*.

Peralatan yang digunakan umumnya adalah peralatan untuk mendukung inokulasi bakteri, peralatan untuk menguji gradasi butiran, berat jenis, permeabilitas, *scanning electron* serta kuat geser tanah.

Setelah peralatan dan bahan yang akan digunakan tersedia, maka dilakukan pengayakan terhadap material pasir tersebut. Pasir yang digunakan adalah pasir yang lolos ayakan ukuran 2 mm. Untuk selanjutnya dilakukan pengovenan terhadap pasir selama ± 1 jam untuk memastikan bakteri dan kuman yang sebelumnya telah ada dalam tanah mati, agar tidak mengganggu proses inokulasi mikrobakteri yang diinginkan. Setelah proses sterilisasi selesai pasir didinginkan terlebih dahulu dalam suhu ruangan kurang lebih 1 jam. Selanjutnya material pasir tadi dibagi menjadi 6 sampel dengan berat 2500 gram untuk tiap sampel. 6 sampel tersebut terdiri dari 1 sampel pasir sebagai kontrol dan 5 sampel untuk proses inokulasi. Kemudian 5 sampel pasir tadi ditambahkan dengan media pertumbuhan bakteri yang terdiri dari 0,25 gr CaCl_2 , 0,25 gr MgSO_4 , 2,5 gr K_2HPO_4 , dan 25 gr sukrose pada setiap 2500 gr sampel pasir sungai. Setelah didiamkan kurang lebih 1 jam kemudian dimasukkan mikrobakteri sebanyak 25 ml untuk setiap sampel pasir. Untuk sampel kontrol tidak memerlukan perlakuan apapun. Tempatkan kelima sampel tersebut pada timba tertutup agar lebih steril. Kelima sampel yang berisi 5 jenis mikrobakteri didiamkan kurang lebih 30 hari.

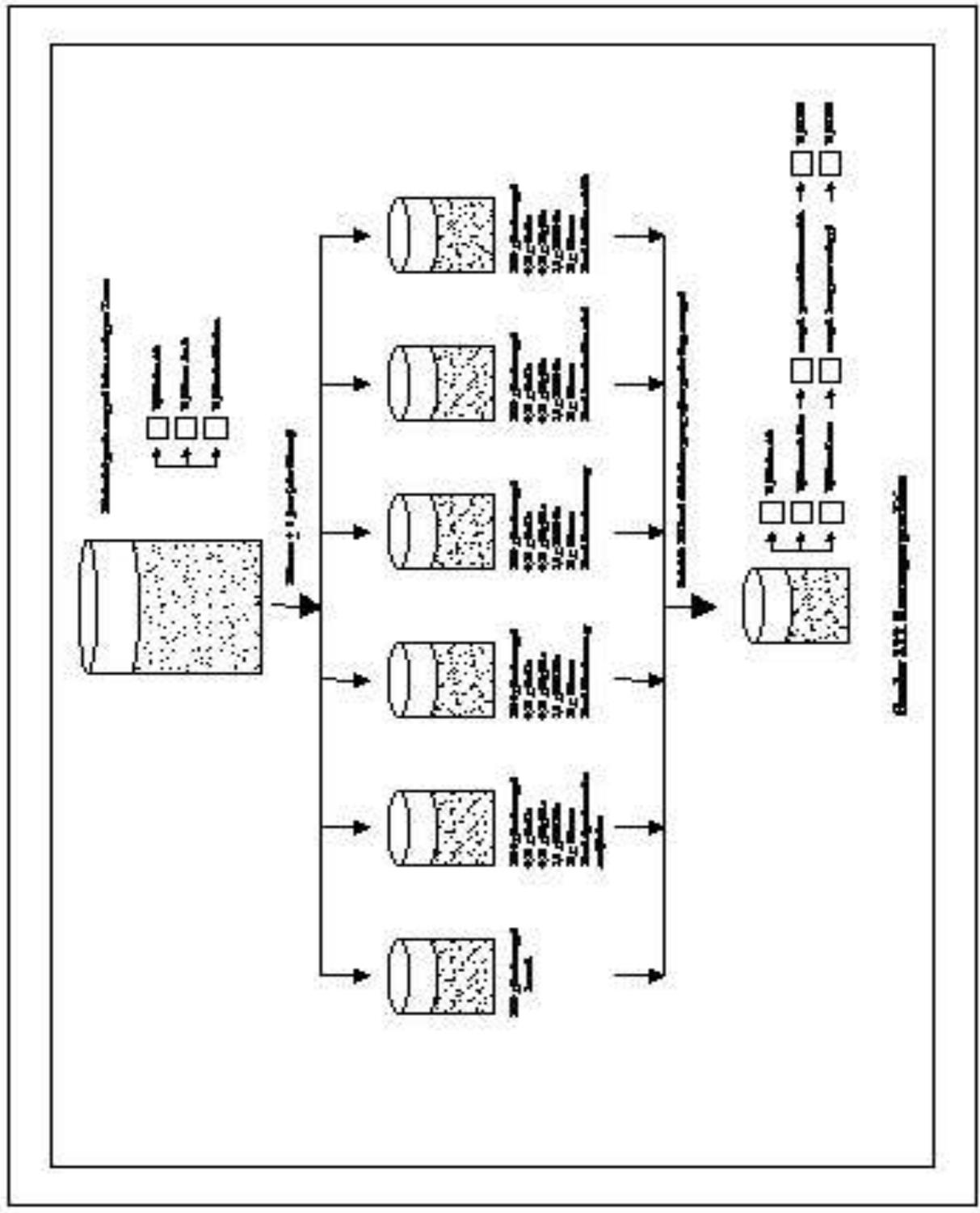
Selama proses inokulasi masih berjalan, dilakukan pula proses pengujian terhadap material pasir tersebut. Pengujian yang dilakukan adalah gradasi butiran, berat jenis dan kadar air. *Grain size* atau gradasi butiran dilakukan untuk mengetahui gradasi dari material pasir tersebut. Berat jenis atau *specific gravity* digunakan untuk mengetahui berat jenis tanah sedangkan kadar air atau *water content* dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung didalamnya.

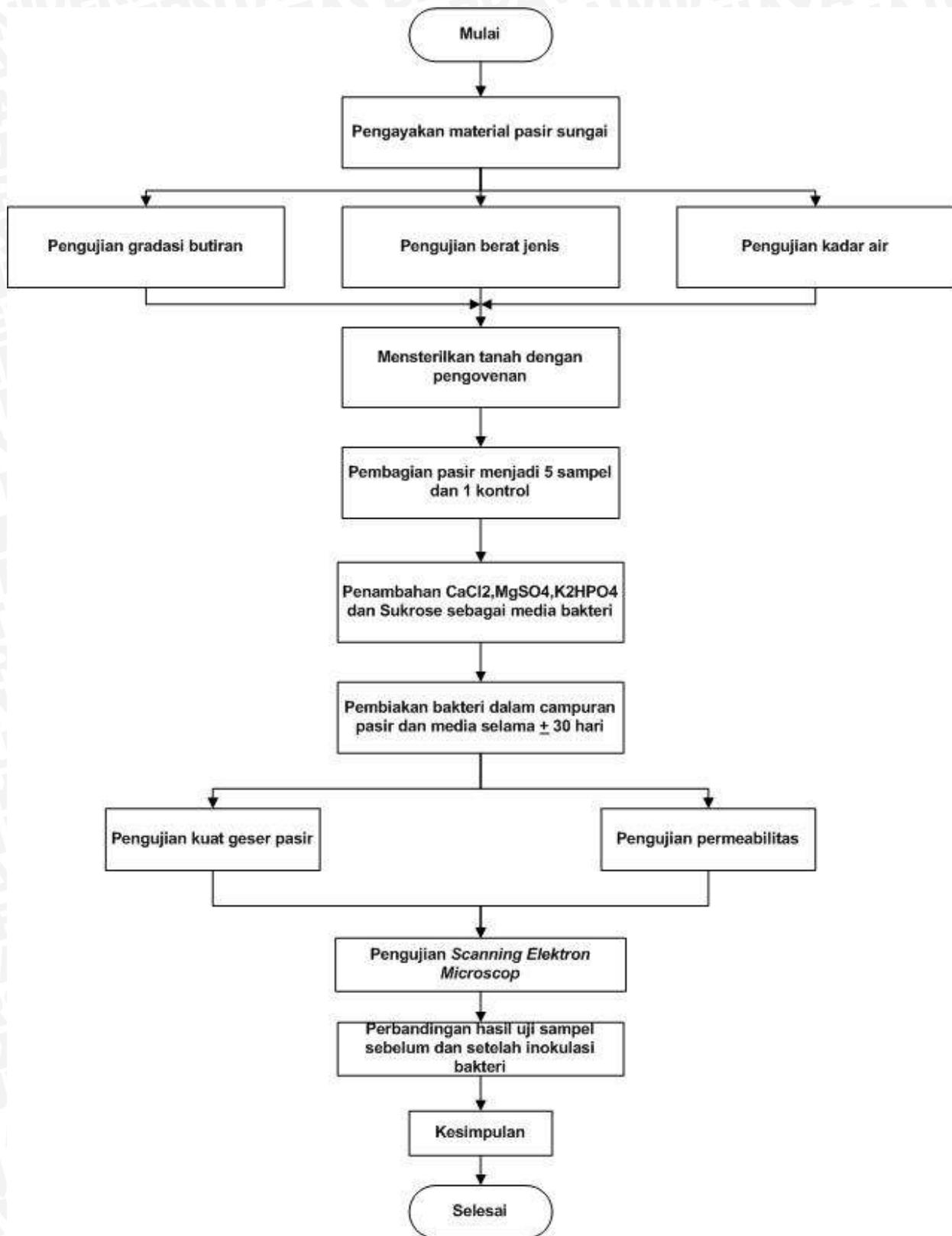
Setelah kurang lebih 30 hari, maka dilakukan pengujian terhadap kelima sampel. Setiap sampel pasir tadi dibagi menjadi 4 bagian, yakni digunakan untuk pengujian permeabilitas, kadar air, kuat geser dan *scanning electron*. Selanjutnya bagian-bagian tadi diuji sesuai dengan pengujiannya. Permeabilitas diuji dengan alat *constant head permeameter* terhadap kelima sampel inokulasi mikrobakteri dan kontrol. Melalui uji permeabilitas akan didapatkan nilai permeabilitas dari masing-masing sampel dan kontrol. Disamping pengujian permeabilitas, dilakukan pula pengujian kuat geser terhadap material inokulasi dan kontrol. Dari pengujian kuat geser akan didapat data kohesi dan sudut geser. Kemudian dilakukan pula pengujian terhadap kadar air dari kelima sampel tadi. Dari pengujian-pengujian permeabilitas dan kuat geser maka hasilnya akan dibandingkan antara sampel 1 dengan sampel lainnya dan dibandingkan pula dengan material

kontrol yang tidak mendapat perlakuan apapun. Berdasarkan hasil pengujian permeabilitas dan kuat geser, maka sampel yang memiliki permeabilitas terendah dan kuat geser tertinggi akan diuji SEM untuk mengetahui perkembangan bakteri maupun *ekstraseluler polisakarida* yang diharapkan terbentuk pada sampel tersebut. Keseluruhan hasil pengujian akan menjadi bahan untuk analisa lebih lanjut. Diharapkan dalam penelitian ini sampel yang diinokulasikan dengan 5 macam mikrobakteri tersebut dapat menurun permeabilitasnya dan meningkat kuat gesernya. Rancangan penelitian, tahapan-tahapan dalam pelaksanaan penelitian dan pengujian dapat dilihat pada gambar-gambar berikut, yakni :

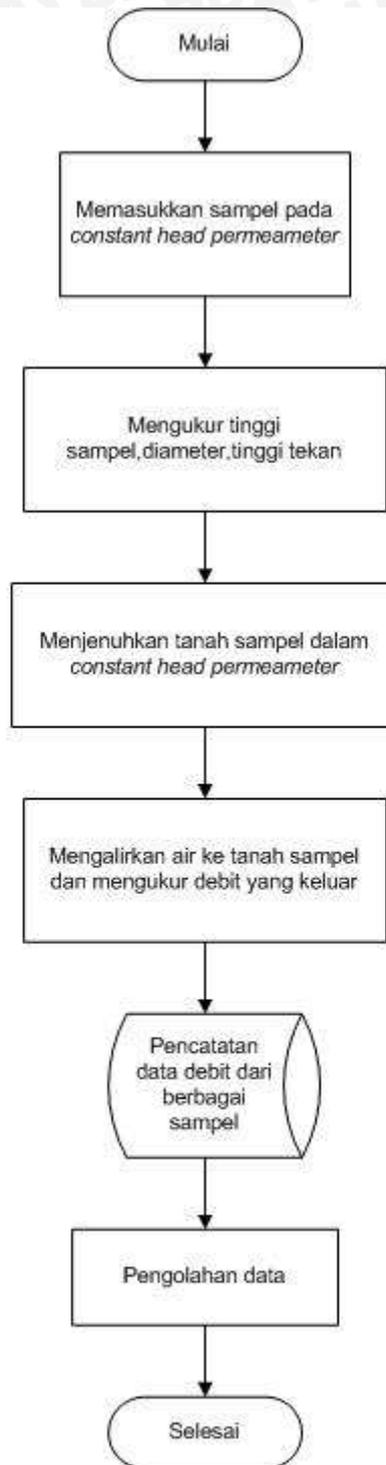
- Gambar 3.22. Rancangan penelitian
- Gambar 3.23. Diagram alir penelitian dan pengerjaan skripsi
- Gambar 3.24. Diagram alir pengujian permeabilitas tanah
- Gambar 3.25. Diagram alir pengujian *direct shear*



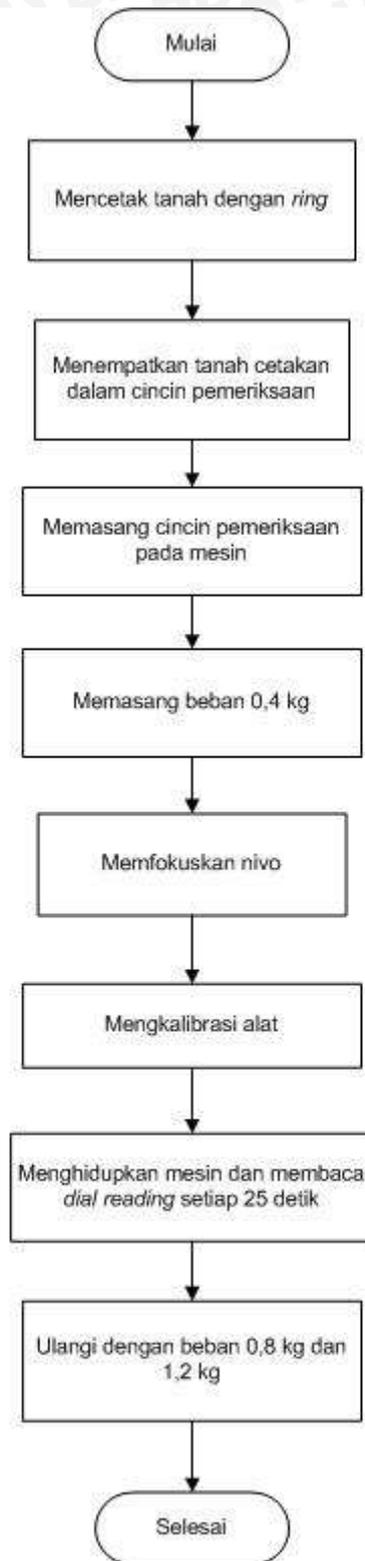




Gambar 3.23. Diagram alir penelitian dan pengerjaan skripsi



Gambar 3.24. Diagram alir pengujian permeabilitas tanah



Gambar 3.25. Diagram alir pengujian *direct shear*