

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan mulai pada bulan Februari hingga Juni 2016. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengolahan Limbah, Laboratorium Teknobi-Industri, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan Laboratorium Kimia Air BBTCLPP Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah gelas pengaduk, desikator, gelas ukur 100 ml dan 500 ml, gelas beker, corong, tabung reaksi, *petridish*, erlenmeyer, mikro pipet, mikro tip, *shaker incubator* JSS1300C, *laminair air flow* ESCO, rak tabung reaksi, pinset, botol kaca, inkubator Memmert, mikroskop cahaya, autoklaf Hirayana HVE50, *microwave* Panasonic, oven, pipet ukur dan pro-pipet, mikropipet, tip, jarum ose, jarum tusuk, *trigalski*, timbangan elektrik AL204, *hair dryer*, lampu spiritus, vortex 37600 Mixer Termolyne, TDS meter HM Digital Tipe TDS-3-1, pH meter Kolkata, Spektrofotometer UV-Vis 1700, Spektrofotometer DR2010/ HACH, plastik *wrap*, karet, label, tabung Durham, aluminium *foil*, *tissue*, kertas payung, kertas saring, kapas, korek api, selang, aerator, dan toples kaca.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah sampel limbah cair *laundry* dari salah satu industri binatu rumahan sebanyak 20 L, lumpur

sawah, akuades steril, alkohol 70%, medium Nutrient Agar, medium Nutrient Broth, larutan *AP Seed*, larutan *phenolphthalein*, larutan H_2SO_4 pekat, larutan Amonium Molibdat, larutan *Stannous Chloride*, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, cat nigrosin, H_2O_2 3%, larutan amilum 1%, medium glukosa cair, medium sukrosa cair, medium laktosa cair, medium nitrat cair, medium hidrolisis pati, larutan *phenol red*, larutan α -naphtalamin, asam sulfanilat, medium kasein, eter, larutan *Erlich*, akuades, urea, dan gula.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan variasi jenis isolat bakteri Indigenus AW 1, AW 2 dan Campuran yang dilakukan selama 2 (dua) minggu dengan 3 (tiga) kali pengulangan untuk setiap perlakuan. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan percobaan pemanfaatan bakteri indigenus dalam bioremediasi limbah binatu dengan medium lumpur aktif

Waktu (T)	Ulangan	Jenis Bakteri (B)			
		AW 1(1)	AW 2 (2)	Campuran(3)	Kontrol(4)
Minggu 1	1	B ₁ T ₁	B ₂ T ₁	B ₃ T ₁	B ₄ T ₁
	2	B ₁ T ₁	B ₂ T ₁	B ₃ T ₁	B ₄ T ₁
	3	B ₁ T ₁	B ₂ T ₁	B ₃ T ₁	B ₄ T ₁
Minggu 2	1	B ₁ T ₂	B ₂ T ₂	B ₃ T ₂	B ₄ T ₂
	2	B ₁ T ₂	B ₂ T ₂	B ₃ T ₂	B ₄ T ₂
	3	B ₁ T ₂	B ₂ T ₂	B ₃ T ₂	B ₄ T ₂

Keterangan :

- B = Jenis Isolat Bakteri
- B₃ = Isolat campuran AW1: AW2 (50% : 50%)
- T = Lama waktu remediasi dengan lumpur aktif
- Kontrol = Tanpa penambahan bakteri Indigenus

D. Cara Kerja

1. Pengambilan Sampel Limbah *Laundry* (Pergub. DIY No.7; Anonim c, 2008)

Sampel limbah cair *laundry* untuk penelitian di ambil dari salah satu usaha *laundry* yang berada Kelurahan Sinduadi Sleman, Yogyakarta dan berasal dari proses pencucian utama sampai pembilasan sebelum dibuang di selokan atau saluran pembuangan. Limbah *laundry* diambil sebanyak 20 L menggunakan jerigen/ wadah penyimpan sampel limbah cair yang telah disiapkan. Wadah dibilas dengan limbah cair sebanyak 3 kali. Sampel limbah diambil, dan dimasukkan ke dalam wadah untuk dianalisis. Sampel diambil pada tanggal 19 Mei 2016.

2. Isolasi Bakteri Limbah Cair

- a. Sterilisasi Alat dan Medium (Zimbro dkk., 2009)

Alat-alat dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas payung. Medium yang masih cair dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan kertas payung. Alat dan bahan yang akan disterilisasi dimasukkan ke dalam autoklaf dan dipanaskan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm (atmosfer) selama 15 menit untuk bahan dan 20 menit untuk alat.

b. Pembuatan Medium *Nutrient Agar* (*Thermo Fischer Scientific*, 2015a dengan modifikasi)

Bubuk NA sebanyak 2,8 g ditimbang menggunakan neraca elektrik dan kemudian ditambahkan 100 ml akuades dalam labu ukur berukuran 250 ml, selanjutnya digojog hingga tercampur. Labu ukur dipanaskan ke dalam *microviwe* hingga larutan menjadi homogen. Setelah itu dilakukan sterilisasi medium. Sterilisasi yang paling umum dengan menggunakan panas salah satunya autoklaf yang menggunakan panas bertekanan dengan suhu 121°C selama 15 menit, dengan tekanan 1 atm atau 15 psi (*pounds of pressure*).

c. Isolasi Bakteri Limbah *Laundry* (Barrow dan Feltham, 2003)

Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam 9 ml air steril (pengenceran 10 kali), kemudian divortex agar larutan sampel menjadi homogen. Sampel diencerkan berdasarkan seri pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-5} dengan air akuades steril. Seri pengenceran 10^{-3} hingga 10^{-5} dipipet 0,1 ml kemudian dipindahkan di atas medium NA dalam cawan petri. Sampel disebar merata di atas medium Agar dengan menggunakan tongkat gelas. Setelah itu sampel diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37°C.

Isolat bakteri dominan 1 dihitung dengan metode perhitungan secara langsung menggunakan hemositometer. Isolat bakteri yang telah diencerkan dengan konsentrasi 10^{-3} dan 10^{-4} diambil sebanyak 1 tetes lalu ditetaskan ke hemositometer. Jumlah bakteri yang terdapat di 5 kotak dalam bilik dihitung menggunakan

handcounter. Hal ini juga dilakukan pada isolat bakteri dominan 2.

Total bakteri kemudian dihitung dengan rumus:

$$\sum \text{bakteri} = \bar{X}_{total} \times 25 \times 10 \times 10^3 \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Koloni yang tumbuh di medium NA dan yang seragam dalam hal bentuk, warna dan jenis permukaannya dipilih, kemudian dipindahkan (subkultur) ke medium NA baru dengan menggunakan jarum ose. Selanjutnya medium kultur diinkubasi kembali dalam inkubator. Subkultur dilakukan selama 3 kali atau hingga didapatkan isolat murni. Isolat yang didapat kemudian disimpan di atas media Agar miring pada suhu ruang dan di dalam medium NA pada suhu 37°C.

- d. Pembuatan Medium *Nutrient Broth* cair (*Thermo Fischer Scientific*, 2015a dengan modifikasi)

Bubuk NB sebanyak 1,3 g ditimbang menggunakan neraca elektrik dan kemudian ditambahkan 100 ml akuades dalam labu ukur berukuran 250 ml, kemudian dogojog hingga homogen. Setelah itu dilakukan sterilisasi medium dengan menggunakan metode autoklaf yang menggunakan panas bertekanan dengan suhu 121°C selama 15 menit, dengan tekanan 1 atm atau 15 psi (*pounds of pressure*).

3. Karakterisasi bakteri

- a. Pengamatan Morfologi Koloni (Capuccino dan Sherman, 2011)

Biakan mikrobial diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium NA dengan metode *Streak Plate*, dan

diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap morfologi koloni yang meliputi bentuk, tepian dan kenaikan (elevation) koloni, kemudian difoto.

b. Pengecatan Gram (Capuccino dan Sherman, 2011)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Akuades diteteskan sebanyak 1 tetes di atas gelas benda. Satu ose biakan bakteri uji diambil dan dicampur dengan tetesan akuades yang ada di gelas benda, kemudian difiksasi dengan menggunakan pengeringan udara atau pemanasan dengan api. Biakan yang telah difiksasi ditetesi secara hati-hati dengan larutan *crystal violet* (Gram A) dan dibiarkan selama satu menit, setelah itu gelas benda dibersihkan menggunakan akuades, kemudian ditetesi larutan Iodin mordant (Gram B) dan dibiarkan selama satu menit., lalu dibersihkan dengan akuades. Alkohol 95% (Gram C) dialiri tetes demi tetes untuk menghilangkan pewarnaan (decolorize) sampai menunjukkan noda biru, kemudian dibersihkan dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas saring. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 450 kali, kemudian difoto.

c. Uji Katalase (Capuccino dan Sherman, 2011)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Satu ose biakan bakteri uji diambil dari koloni biakan dan dipindahkan pada gelas benda yang sudah dibersihkan. Diteteskan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3%, kemudian diamati adanya gelembung

udara atau tidak. Hasil positif menunjukkan adanya gelembung udara, kemudian difoto.

d. Uji Sifat Biokimia (Waluyo, 2010)

Sifat biokimia bakteri dapat diketahui dengan uji fermentasi karbohidrat, uji reduksi nitrat, dan uji pembentukan indol. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan cara, satu ose biakan bakteri uji diambil kemudian diinokulasikan pada medium cair laktosa, sukrosa, dan glukosa, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. pengamatan terhadap perubahan warna medium dan pembentukan gas diamati setelah inkubasi selama 24 jam.

Uji reduksi nitrat dilakukan dengan cara satu ose biakan bakteri uji diambil kemudian diinokulasikan pada medium nitrat cair dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. pengujian adanya nitrat dilakukan setelah 2 hari masa inkubasi dengan menambahkan 1 ml asam sulfanilat dan 1 ml α -naftalamin dan digojog hingga terjadi perubahan warna menjadi merah yang menunjukkan hasil positif.

Uji pembentukan indol dilakukan dengan cara satu ose biakan bakteri uji diambil kemudian diinokulasikan pada medium triptofan cair atau hidrolisat kasein, kemudian diinkubasi selama 4 hari pada suhu 37°C. Pengujian indol dilakukan setelah 4 hari menggunakan metode Coles dan Onslow (untuk indol dalam bentuk uap), kapas penutup tabung bagian bawah ditetesi dengan reagen erlich, kemudian tabung direndam pada suhu 80°C sehingga terjadi

perubahan warna kapas menjadi merah ungu yang menunjukkan adanya indol.

e. Identifikasi Bakteri

Berdasarkan karakter dari masing-masing isolat bakteri yang paling dominan, diidentifikasi dengan menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th edition*.

4. Perbanyak Isolat Bakteri dan Pembuatan Starter

a. Perbanyak Isolat Bakteri (Hadioetomo, 1993 dengan modifikasi)

Kedua isolat bakteri yang dominan masing-masing diinokulasikan kedalam medium NA secara *streak plate*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat bakteri hasil perbanyak diambil sebanyak 10 ose kemudian dimasukkan ke dalam 100 ml medium NB pada Erlenmeyer secara aseptis kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

b. Pembuatan Starter (Sitanggang, 2008 dengan modifikasi)

Pembuatan starter dilakukan menggunakan Isolat bakteri hasil perbanyak diambil sebanyak 30 ose kemudian dimasukkan kedalam 240 ml medium NB yang kemudian ditambahkan dengan 60 ml limbah *laundry* pada Erlenmeyer secara aseptis kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* selama 24 jam dengan suhu 37°C. Starter sebanyak 40 ml ditambahkan kedalam lumpur aktif.

- c. Pembuatan Lumpur Aktif (Sitanggang, 2008; Salib, 2003 dengan modifikasi)

Isolat bakteri dipersiapkan dengan mengisolasi bakteri dari biakan murni yang telah diidentifikasi menggunakan ose dalam tabung reaksi yang mengandung 10 ml medium broth dan diinkubasi selama 24 jam. Pembuatan lumpur aktif menggunakan lumpur sawah pada 9 toples kaca yang masing-masing ditambahkan 2 liter limbah cair *laundry*. Masing-masing bioreaktor menggunakan aerasi. Selain itu juga ditambahkan pupuk urea sebanyak 20g, dan gula 50g sebagai nutrisi untuk pertumbuhan bakteri.

Toples kaca I diberi penambahan isolat AW1 sebanyak 4 tabung reaksi (masing-masing tabung reaksi berisi 10 ml), toples kaca ini sebagai perlakuan B1. Toples kaca II diberi penambahan isolat AW2 ditambahkan sebanyak 4 tabung reaksi, toples kaca ini sebagai perlakuan B2. Toples kaca III diberi penambahan isolat campuran sebanyak 4 tabung reaksi dengan dua tabung reaksi isolat AW1 dan dua tabung reaksi isolat AW2, toples kaca ini sebagai perlakuan B3. Setiap perlakuan dilakukan uji aktivitas degradasi setiap minggu selama 1 bulan.

5. Uji Kemampuan Isolat Bakteri dalam Degradasi Limbah *Laundry*

- a. Pengukuran Derajat Keasaaman (pH) (Anonim a, 2004)

Elektroda dikeringkan dengan kertas tisu, kemudian dibilas dengan air suling. Setelah dibilas dengan air suling, elektroda dibilas

dengan sampel limbah *laundry*. Elektroda dicelupkan kedalam contoh uji sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap. Hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter dicatat.

b. Pengukuran BOD (Anonim c, 2008)

Sampel uji digojog dan diambil sebanyak 1 ml/100 ml akuades menggunakan mikrotip. Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambah akuades hingga tanda batas. Labu ukur kemudian digojog. Sampel kemudian dituang ke dalam Erlenmeyer kemudian diberi tanda/ label sesuai pengenceran yang dilakukan terhadap sampel. Sampel sebanyak 8 ml diambil kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 200 ml dan ditambah *AP Seed* sebanyak 200 ml atau hingga tanda batas lalu digojog.

Botol BOD disiapkan dan dibilas dengan akuades, kemudian sampel dimasukkan ke dalam botol BOD. Pastikan tidak ada gelembung di dalam botol agar tidak mempengaruhi pembacaan DO meter. DO meter terlebih dahulu dibilas dengan sampel uji, kemudian sampel uji dituang ke dalam tempat penampung sampel. Sampel uji dimasukkan ke dalam DO meter hingga tanda batas. DO meter diposisikan vertikan dengan tempat penampung sampel uji di bagian atas. Hasil diamati dan dicatat. Pada DO5, botol BOD disimpan di dalam inkubator pada suhu $20^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Penentuan kadar BOD₅ ditentukan menggunakan rumus :

$$\text{BOD} = \text{DO}_{(0)} - \text{DO}_{(5)}$$

$$\text{Kadar } O_2 \text{ (mg/l)} = \frac{(\text{ml} \times N) \text{pentitrian} \times 8000}{\text{ml sampel} - 2}$$

$$\text{DO} = \text{Kadar } O_2 \text{ (mg/l)} \times \text{faktor pengenceran}$$

c. Pengukuran zat padat tersuspensi (*Total Suspended Solid*)

Pengukuran TSS ini menggunakan metode yang digunakan oleh laboratorium kimia air BBTKLPP Yogyakarta (APHA, 1992)

Tombol power ON spektrofotomer ditekan, kemudian “Progam 630” dimasukkan dan tekan enter. Akuades diambil dan dimasukkan ke dalam botol sampel sebagai larutan blangko. Akuades di ambil dan dimasukkan ke dalam *cell sample* kemudian ditutup dan tekan tombol “ZERO”. Sampel uji digojog dan kemudian dimasukkan ke dalam botol sampel. Sampel uji diletakkan didalam *cell sample*, kemudian ditutup. Tombol “READ” ditekan. Konsentrasi yang muncul pada layar monitor dibaca dan dicatat.

d. Pengukuran Kadar Fosfat

Perhitungan konsentrasi fosfat menggunakan Metode Biru Molibdat (APHA, 1992)

Sampel uji diambil sebanyak 100 ml dimasukkan kedalam Erlenmeyer, ditambahkan indikator PP sebanyak 1 tetes. Apabila warna berubah menjadi merah muda ditambahkan dengan H₂SO₄ pekat hingga warna menjadi bening. Jika warna larutan bening dilanjutkan dengan menambahkan larutan Amonium Molibdat

sebanyak 4 ml dan larutan *Stannous Chloride* sebanyak 0,5 ml. Didiamkan lebih kurang selama 10 menit. Kemudian larutan diambil dengan menggunakan pipet ukur dan dimasukkan ke dalam kuvet. Selanjutnya dilakukan pembacaan pada Spektrofotometer UV-Vis 1700 dengan panjang gelombang 889nm. Pembacaan dilakukan selama kurang lebih 10 hingga 12 menit. Hasil yang muncul pada layar dicatat sebagai ppm kurva fosfat.

$$\text{Kadar fosfat m.e.l}^{-1} = \text{ppm kurva/bst kation} \times \text{fp}$$

Keterangan :

ppm kurva = kadar contoh yang didapat dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi blanko.
Fp = faktor pengenceran
Bst PO4 = 95/31

E. ANALISIS DATA

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan Anava, dan untuk mengetahui letak beda nyata antarperlakuan maka dilakukan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95% (Gazpersz, 1991). Data yang diperoleh diolah dengan program SPSS 15.