

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang telah dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juni 2016. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknobia Industri dan Laboratorium Pengolahan Limbah, Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Pengambilan sampel dilakukan di Batik Winotosastro yang terletak di kota Yogyakarta. Pengujian logam Zn (Seng), BOD, dan TSS dilakukan di Laboratorium Fisika Kimia Air, Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah gelas ukur 250 ml, gelas ukur 1000 ml, gelas beker 1000 ml, corong, tabung reaksi, rak tabung reaksi, petridish, timbangan analitik Mettler Toledo A1204, erlenmeyer 50 ml, erlenmeyer 100 ml, erlenmeyer 250 ml, erlenmeyer 500 ml, labu ukur 25 ml, labu ukur 100 ml, labu ukur 200 ml, mikropipet, mikro tip, *hand counter* Joyko, lampu spiritus, inkubator Memmert, *shaker inkubator JSSI300C*, pipet tetes, *Laminair Air Flow ESCO*, mikroskop, autoklaf Hirayama hiclave HVE50, oven Venticell, pro pipet, pipet ukur, jarum ose, trigalski, *microwave* Panasonic, vortex 37600 Mixer Termolyne, tabung Durham, *hairdryer* Philips, kamera SLR Canon, kamera *Handphone*, selang, aerator Lion, toples kaca, *haemocytometer Assistant Germany*, gelas pengaduk, gelas benda, pH meter Trans Instruments, TDS meter HM Digital, botol Winkler, botol kaca, buku *Bergey's Manual of*

Determinative Bacteriology 7th edition, jerigen polyeten 2,5 L, 5 L, dan 10 L, DO Meter HACH *Portable Dissolve Oxygen*, dan *Spectrophotometer* HACH DR/2010.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah limbah indigosol abu-abu industri batik Winotosastro, tissue, plastik wrap, plastik klip, korek api, gloves, masker, kapas, karet, kertas payung, label, aquades steril, alkohol 70%, kertas saring, medium Nutrient Agar, medium Nutrient Broth, cat Gram A (Crystal violet), cat Gram B (Iodin mordant), cat Gram C (Alkohol 95%), cat Gram D (Larutan Safranin), cat nigrosin, H₂O₂ 3%, medium glukosa cair, medium sukrosa cair, medium laktosa cair, medium nitrat cair, larutan α -naphhtalamin, asam sulfanilat, medium triptofan, reagen Ehrlich, AP seed, dan larutan blangko.

C. Rancangan Percobaan

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan variasi penambahan isolat bakteri yaitu isolat bakteri 1 (NH 1), isolat bakteri 2 (NH 2), dan isolat bakteri campuran (campuran NH 1 dan NH 2). Setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Rancangan percobaan dalam penelitian ini ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan Percobaan Penambahan Isolat Bakteri Indigenus dalam Remediasi Limbah Indigosol Abu-abu Menggunakan Metode Lumpur Aktif

Ulangan	Perlakuan Variasi Penambahan Isolat Bakteri (Y)			
	NH 1	NH 2	Campuran	Kontrol
1	Y1	Y2	Y3	Y4
2	Y1	Y2	Y3	Y4
3	Y1	Y2	Y3	Y4

Keterangan:

Y = Isolat Bakteri

NH (1) = Bakteri Dominan 1

NH (2) = Bakteri Dominan 2

Campuran = Campuran Bakteri Dominan 1 dan 2

Kontrol = Tanpa Penambahan Bakteri Indigenus

D. Tahap Penelitian dan Cara Kerja

Penelitian ini terdiri dari 5 tahapan utama yaitu pengambilan sampel dan karakterisasi sampel, isolasi dan identifikasi bakteri dominan, pengolahan limbah menggunakan lumpur aktif, uji aktivitas degradasi, dan analisis data untuk penentuan hasil penelitian secara keseluruhan.

1. Teknik Pengambilan Sampel Limbah Cair (Hadi, 2005; SNI 6989.58, 2008)

Jerigen penyimpan sampel limbah cair dibilas dengan limbah cair sebanyak 3 kali. Limbah indigosol abu-abu sebanyak 10 L dimasukkan ke dalam jerigen polyetilen 10 L, kemudian jerigen ditutup rapat. Sampel diambil dari bak penampungan limbah cair pewarna indigosol abu-abu. Sampel dibawa ke laboratorium untuk disimpan dan dilakukan pengujian dalam waktu kurang dari atau sama dengan 3 hari sejak pengambilan sampel.

2. Pembuatan Medium Pertumbuhan Bakteri

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

Serbuk NA sebanyak 28 g/l dilarutkan dalam aquades, kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* hingga homogen. Medium agar tegak dan miring dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing, sedangkan sisanya tetap disimpan dalam erlenmeyer untuk selanjutnya digunakan sebagai medium petri. Medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Medium

agar miring diletakkan pada posisi miring, sedangkan medium agar petri dituangkan ke dalam petridish. Seluruh medium didinginkan pada suhu ruang (25°C) hingga mengeras.

- b. Pembuatan *Nutrien Broth Cair* (Thermo Fischer Scientific, 2015b dengan modifikasi)

Serbuk NB sebanyak 13 g/l dilarutkan dalam akuades. Medium dipindahkan dari erlenmeyer ke dalam tabung reaksi masing-masing. Medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit .

3. Sterilisasi Alat dan Medium (Cappucino dan Sherman, 2011)

Alat-alat dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas payung. Medium 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 medium dan 20 menit untuk alat.

4. Isolasi Bakteri pada Limbah Cair Industri Batik (Barrow dan Feltham, 2003; Hidayat dkk., 2014; Jutono dkk., 1980)

Sampel yang digunakan untuk isolasi diambil langsung dari limbah indigosol abu-abu industri batik. Sampel diencerkan berdasarkan seri pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-8} , kemudian divortex. Seri pengenceran 10^{-3} hingga 10^{-8} diambil sebanyak 0,1 ml, setelah itu dipindahkan di atas medium NA dalam cawan petri. Sampel diinokulasikan pada medium NA secara

spread plate. Sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Hasil isolasi dfoto dengan kamera SLR Canon.

Koloni yang tumbuh di medium NA dipilih, yang seragam dalam hal bentuk, warna, dan jenis permukaannya. Penentuan jumlah koloni bakteri dominan dihitung dengan menggunakan metode *plate count*. Syarat perhitungan dengan metode *viable count* yang harus dipenuhi yaitu:

1. Jumlah koloni tiap petridish antara 30-300 koloni, jika memang tidak ada yang memenuhi syarat dipilih yang jumlahnya mendekati 300.
 2. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petridish, koloni tersebut dikenal sebagai *spreader*.
 3. Perbandingan jumlah bakteri dari hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya, jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar dari 2 yang dipakai jumlah mikrobial dari hasil pengenceran sebelumnya.
 4. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata.
- Setelah memenuhi persyaratan, jumlah koloni bakteri dihitung dengan

rumus :

$$\sum \text{bakteri} = \bar{X} \times \frac{1}{f.\text{pengenceran}} \times 10 \text{ CFU}/\text{ml}$$

Keterangan:

\bar{X} = Rata-rata jumlah koloni bakteri

f = Faktor

Kemudian dipindahkan (subkultur) ke medium NA baru dengan menggunakan jarum ose. Selanjutnya media kultur diinkubasi kembali dalam

inkubator. Subkultur dilakukan selama 3 kali atau hingga didapatkan isolat murni, isolat yang diperoleh selanjutnya disimpan pada medium NA miring pada suhu 15°C.

5. Karakterisasi Bakteri

a. Pengamatan Morfologi Koloni (Barrow dan Feltham, 2003)

Karakterisasi bakteri diawali dengan melakukan pengamatan morfologi koloni bakteri. Bakteri sebanyak 1 ose diambil lalu dilakukan pengenceran hingga 10^{-6} . Seri pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6} diambil sebanyak 0,1 ml selanjutnya diinokulasikan secara *spread plate* pada medium *Nutrient Agar* (NA) dalam petridish. Petridish yang diinokulasikan dengan bakteri uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu diamati morfologi koloni bakteri uji yaitu bentuk dan warna, tepi serta elevasi koloni lalu koloni bakteri pada petridish difoto dengan kamera SLR Canon.

b. Pengecatan Gram (Cappucino dan Sherman, 2011)

Gelas benda dibersihkan menggunakan alkohol. Satu ose biakan bakteri diambil dan dicampur dengan tetesan aquades yang ada di atas gelas benda, kemudian gelas benda difiksasi menggunakan pemanasan dengan api. Biakan yang telah difiksasi ditetesi dengan larutan *crystal violet* (Gram A) dan dibiarkan selama satu menit.

Setelah selesai, dibersihkan dengan akuades. Kemudian ditetesi dengan larutan *Iodin mordant* (Gram B) dan dibiarkan selama satu menit, lalu dibersihkan lagi dengan akuades. Alkohol 95% (Gram C) dialirkan tetes demi tetes untuk menghilangkan pewarnaan (*decolorize*) sampai

menunjukkan noda biru, setelah itu dibersihkan dengan akuades. Dilakukan pewarnaan kembali dengan larutan safranin (Gram D) selama 45 detik, kemudian dibersihkan dengan akuades dan dikeringkan. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 50-100 kali, kemudian difoto dengan kamera *Handphone*.

c. Uji Katalase (Cappucino dan Sherman, 2011)

Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri sebanyak 1 ose, kemudian ditetesi dengan H_2O_2 3% sebanyak 1-2 tetes pada gelas benda. Bila terbentuk buih ataupun gelembung, maka hasilnya positif. Jika tidak terbentuk buih atau gelombang, maka uji ini dianggap negatif. Kemudian hasil difoto dengan kamera SLR Canon.

d. Uji sifat biokimia (Waluyo, 2010)

Sifat biokimia bakteri diuji dengan uji fermentasi karbohidrat, uji reduksi nitrat, dan uji pembentukan indol. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan cara, satu ose biakan bakteri diambil kemudian diinokulasikan pada medium cair laktosa, dekstrosa (glukosa), dan sukrosa. Masing-masing medium berisi tabung Durham.

Medium cair tersebut diinkubasi selama 48 jam pada suhu $37^{\circ}C$. Setelah 48 jam dilakukan pengamatan kemudian difoto dengan camera Canon. Hasil positif dapat dilihat dengan adanya perubahan warna indikator merah fenol menjadi kuning serta pembentukan gas, yaitu dengan terlihatnya udara di dalam tabung Durham. Kemudian hasil difoto dengan kamera SLR Canon.

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

Uji pembentukan indol dilakukan dengan cara, satu ose biakan bakteri diambil kemudian diinokulasikan pada hidrolisat kasein, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah 48 jam, pengujian indol dilakukan dengan menambahkan 1 ml eter pada setiap tabung, digojog dan didiamkan hingga terbentuk lapisan. Setelah itu, reagen Ehrlich eter sebanyak 1 ml ditambahkan secara perlahan melalui dinding tabung. Masing-masing tabung didiamkan dan diamati. Jika terbentuk cincin merah muda menunjukkan hasil positif, kemudian difoto dengan kamera SLR Canon.

e. Uji Motilitas (Barrow dan Feltham, 2003)

Isolat dari agar miring ditusukan secara tegak lurus pada agar tegak *semi solid* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji motilitas bakteri diamati. Uji motilitas dinyatakan positif jika pertumbuhan koloni menyebar luas pada agar tegak, kemudian difoto dengan kamera SLR Canon.

6. Identifikasi Bakteri (Breed dkk., 1957)

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

7. Perbanyakkan Bakteri (Hadioetomo, 1993 dengan modifikasi)

Kultur bakteri dari kedua isolat dominan diinokulasikan ke dalam medium NA miring secara *streak plate*, inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam.

8. Karakterisasi Sampel Limbah

Sampel limbah dianalisis kandungan BOD, pengukuran zat padatan tersuspensi (TSS), pengukuran total zat padat terlarut (TDS), pengukuran kadar logam berat Zn, suhu, dan pH.

a. Pengukuran BOD (SNI 6989.72, 2009).

Sampel diencerkan terlebih dahulu sebelum dilakukan pengukuran oksigen terlarut. Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam labu ukur dengan volume 100 ml lalu akuades ditambahkan hingga tanda batas, labu ukur dikocok beberapa kali. Setelah itu larutan diambil 8 ml lalu ditambahkan ke dalam labu ukur dengan volume 200 ml dan ditambahkan *AP Seed* sebanyak 200 ml. Labu ukur dikocok dua kali.

Dua buah botol DO disiapkan, masing-masing botol ditandai dengan notasi A₁ dan A₂. Larutan dimasukkan ke dalam masing-masing botol DO A₁ dan A₂ hingga meluap supaya tidak ada gelembung udara di dalam botol, kemudian botol DO. Botol A₂ disimpan dalam lemari inkubator

20°C ± 1°C selama 5 hari. Pengukuran dilakukan terhadap larutan dalam botol A₁ dengan alat DO meter. Hasil pengukuran merupakan nilai oksigen terlarut nol hari (A₁), sedangkan untuk botol A₂ yang telah diinkubasi 5 hari. Hasil pengukuran yang diperoleh merupakan nilai oksigen terlarut 5 hari. Perhitungan nilai BOD₅ :

$$BOD_5 = \frac{(A_1 - A_2) - \left(\frac{B_1 - B_2}{V_B}\right)V_C}{P}$$

Dengan pengertian

- BOD₅ : nilai BOD₅ contoh uji (mg/L)
- A₁ : kadar oksigen terlarut contoh uji sebelum inkubasi (0 hari) (mg/L)
- A₂ : kadar oksigen terlarut contoh uji setelah inkubasi (5 hari) (mg/L)
- B₁ : kadar oksigen terlarut blanko sebelum inkubasi (0 hari) (mg/L)
- B₂ : kadar oksigen terlarut blanko setelah inkubasi (5 hari) (mg/L)
- V_B : volume suspensi mikroba dalam botol DO blanko (mL)
- V_c : volume suspensi mikroba dalam botol contoh uji (mL)
- P : perbandingan volume contoh uji (V₁) per volume total (V₂)

- b. Pengukuran Zat Padat Tersuspensi (*Total Suspended Solid*) (HACH Company, 1999)

Spektrofotometer dihidupkan, tekan angka 6 3 0 untuk program zat padat tersuspensi. Setelah itu panjang gelombang diatur hingga 810 nm. Air suling dimasukkan sebagai blanko dalam botol sampel. Blanko ditempatkan dalam *cell sample*, ditutup, lalu tekan tombol *zero*. Setelah itu blanko dikeluarkan dari *cell sample*.

Sampel digojog terlebih dahulu lalu segera dimasukkan ke dalam botol sampel. Kemudian sampel ditempatkan dalam *cell sample*, ditutup, lalu tekan tombol *read*. Konsentrasi TSS pada layar monitor dicatat.

c. Pengukuran Total Zat Padat Terlarut (TDS) (Harahap, 2012).

Alat TDS meter dihidupkan dan dibilas dengan air suling dan sampel. TDS meter dicelupkan ke dalam gelas ukur yang berisi sampel, lalu tunggu 2-5 menit hingga pembacaan pada alat stabil. Hasil dicatat tanpa mengangkat TDS meter dari permukaan sampel. Setelah selesai digunakan, TDS meter dimatikan kemudian dibilas kembali dengan air suling lalu dikeringkan dengan kertas tisu.

d. Pengukuran Kadar Logam Berat Zn (SNI 6989.7, 2009).

Gelas beker ukuran 100 ml disiapkan. Sampel limbah sebanyak 50 ml ditambahkan ke dalam gelas beker. Kemudian HNO_3 65% sebanyak 5 ml ditambahkan ke dalam gelas beker dalam lemari asam. Campuran larutan lalu dipanaskan hingga larutan berkurang menjadi ± 20 ml.

Perlakuan tersebut diulang kembali hingga larutan menjadi jernih. Larutan yang telah jernih disaring menggunakan kertas saring. Larutan hasil saringan, diencerkan menggunakan aquades hingga menjadi 10 ml. Larutan sampel tersebut siap diuji menggunakan SSA (Spektrofotometer Serapan Atom).

Spektrofotometer serapan atom dilakukan optimalisasi. Setiap larutan standar logam Zn diukur pada panjang gelombang 213,9 nm. Kemudian, kurva kalibrasi dibuat untuk mendapatkan persamaan garis regresi. Setelah terdapat persamaan regresinya, dilanjutkan dengan pengukuran larutan sampel yang telah dipersiapkan.

$$Y = aX + b$$

Keterangan:

Y = absorbansi sampel

a = Intersep

X = Konsentrasi sampel

b = Slop

e. Pengukuran Derajat Keasaman (pH) (SNI 06-6989.11, 2004)

Kalibrasi alat pH meter dengan larutan penyangga dilakukan sesuai instruksi kerja alat tersebut setiap kali melakukan pengukuran. Sampel yang memiliki suhu tinggi diatas 30°C, dikondisikan terlebih dahulu hingga suhu turun menjadi 25-27°C. pH meter lalu dikeringkan dengan kertas tisu dan elektroda dibilas dengan air suling. Selanjutnya elektroda dibilas dengan sampel, kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sampel hingga pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap. Hasil pembacaan pada pH meter dicatat.

f. Pengukuran Suhu (SNI 06-6989.23, 2005)

Termometer langsung dicelupkan ke dalam contoh uji dan dibiarkan 2-5 menit sampai termometer menunjukkan nilai yang stabil. Pembacaan pada skala termometer dicatat tanpa termometer diangkat dari dalam air.

9. Pembuatan Starter (Cappuccino dan Sherman, 2011 dengan modifikasi)

Pembuatan starter dilakukan dengan medium *nutrient broth* (NB) secara aseptis. Medium starter sebanyak 240 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu dihomogenkan dan disterilisasikan. Kemudian ditambah 60 ml limbah cair industri batik yang berasal dari sisa pencelupan pewarna indigosol abu-abu. Bakteri NH (1) dan NH (2) yang telah diidentifikasi serta bakteri campuran, masing-masing diambil sebanyak 30 ose lalu dimasukkan

ke dalam erlenmeyer. Inkubasi pada *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37°C.

Isolat bakteri (starter) dihitung dengan menggunakan metode perhitungan secara langsung menggunakan hemositometer. Isolat bakteri yang telah diencerkan dengan konsentrasi 10^{-1} , diambil sebanyak 1 tetes lalu diteteskan ke hemositometer. Hemositometer ditutup dengan gelas penutup dan dipasangkan di mikroskop. Jumlah bakteri yang terdapat di 5 kotak dalam bilik hitung dihitung menggunakan *handcounter*. Total bakteri kemudian dihitung dengan rumus:

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

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

Starter yang telah diinkubasi disiapkan. Pembuatan lumpur aktif menggunakan tanah di sekitar rembesan pembuangan limbah cair industri batik. Pada penelitian ini digunakan 12 toples kaca yang masing-masing ditambahkan tanah 500 gram, 750 ml limbah indigosol abu-abu, dan 2.100 ml akuades. Masing-masing bioreaktor menggunakan aerasi. Selain itu juga ditambahkan NPK 3 gram, gula 50 gram, dan urea 30 gram sebagai nutrisi untuk pertumbuhan bakteri.

Toples kaca I, III, III sebagai perlakuan isolat NH (1), starter ditambahkan sebanyak 40 ml, toples kaca ini sebagai perlakuan A. Toples kaca IV, V, VI sebagai perlakuan menggunakan isolat NH (2) ditambahkan juga sebanyak 40 ml, toples kaca ini sebagai perlakuan B. Toples kaca VII,

VIII, IX sebagai perlakuan menggunakan isolat campuran. Masing-masing isolat NH (1) dan NH (2) ditambahkan 20 ml, toples kaca ini sebagai perlakuan C. Toples kaca X, XI, XII tidak ada penambahan bakteri indigenus, toples kaca ini sebagai kontrol. Setiap perlakuan dan kontrol dilakukan uji aktivitas degradasi pada hari ke-0, hari ke-7, dan hari ke-14.

11. Uji Aktivitas Degradasi

Uji aktivitas degradasi seperti pada uji karakterisasi awal sampel limbah indigosol abu-abu industri batik yaitu pengukuran BOD, zat padatan tersuspensi (TSS), total zat padat terlarut (TDS), kadar logam berat Zn, suhu, dan pH.

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.