

## BAB 4. METODELOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang. Pelaksanaan penelitian berlangsung selama 7 bulan, dari bulan Februari 2016 sampai September 2016.

### 4.2 Sampel Penelitian

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri *Bacillus sp* dari penelitian Yusufa (2012) dengan kode isolat C12. Isolat bakteri berasal dari limbah cucian karkas Rumah Potong Ayam Tradisional Malang daerah Dinoyo.

### 4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, cawan petri, tabung *polypropilen*, tabung reaksi, *backer glass* (250 ml, 500 ml, 1000 ml), tabung erlenmeyer (250 ml, 500 ml, 1000 ml), pipet (5 ml, 10 ml), bulb, gelas ukur (10 ml, 50 ml), pengaduk kaca, mikropipet (Avi Ted), mikrotube, *blue tip*, *yellow tip*, tisu, jarum ose, pembakar bunsen, vortex (Maxi Mix II), timbangan (Metter toledo), *laminar air flow* (LAF) (Nuair Labgard Class II), inkubator (MMM Medcenter), mikroskop cahaya (Olympus TL2), kamera digital (Olympus CX41), *object glass*, *cover glass*, *anerobic jar* (OXOID), *autoclave*, *refrigerator*, *spektrofotometer* (Genesys 20), *sentrifugasi*, pH meter, timbangan analitik dengan

ketelitian 0,1 mg, pengaduk magnetik, pipet volum, neraca analitik, corong gelas, kertas saring, oven, penangas air yang dilengkapi pengatur suhu dan dapat diatur suhunya, labu destilasi. Poppa vakum, adapter destilasi dengan drip tip, desikator, botol gelas mulut besar, dan wadah buangan pelarut.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *aquades*, larutan pengencer *Peptone* (HIMEDIA REF RM 001-500G), media optimasi produksi biosurfaktan (Molasses), media *nutrient broth*, media *nutrient agar*, media *tryptone broth*, media agar darah, media *Triple Sugar Iron Agar*, tioglikolat, oksidase test strip, n-heksan, pepton 1%, reagen *Kovacs*, reagen, larutan iodium, gliserol 60%, spirtus, glukosa, alkohol 70 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %, KOH 3%, pewarna Gram, pewarna spora, NaOH, kertas saring *whatman 42*, asam khlorida atau asam sulfat, (1 : 1); Campur volume yang sama antara asam dan air, pelarut organik (pelarut organik sebaiknya tidak meninggalkan residu pada proses destilasi), n-heksan dengan titik didih 69 °C, Methyl tert buthyl ether (MTBE) titik didih 55 °C sampai dengan 56 °C, kristal natrium sulfat, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat, campuran pelarut, 80% n-heksan: 20% MTBE v/v dan pelarut lain: petroleum benzene atau n-heksan atau petroleum ether atau dichloro methane (DMC).

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat Eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAK) yang dipengaruhi 2 faktor, yaitu konsentrasi dan waktu inkubasi, dengan dua tahap pengujian. Tahap pengujian pertama adalah optimasi produksi biosurfaktan asal *Bacillus sp*, dengan uji *drop collapse* dan

emulsifikasi. Uji *drop collapse* dan emulsifikasi digunakan untuk mengetahui kualitas biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* Uji ini berfungsi untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan suatu molekul. Selanjutnya dilakukan penanaman pada media molasses dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 5%, 10%, dan 15%, selanjutnya diinkubasi selama 24 dan 48 jam. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan secara *duplo*. Tahap pengujian pertama digambarkan pada **Tabel 4.1.** dengan perhitungan ulangan sebagai berikut:

$$P(n-1) \geq 15$$

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,1$$

Keterangan

P = jumlah perlakuan

N = jumlah ulangan yang diperlukan

(Hanafiah, 2005).

**Tabel 4.1** Rancangan penelitian tahap 1

Biosurfaktan	Parameter yang diamati					
	Aktivitas Emulsi			<i>Drop collapse</i>		
	U1	U2	U3	U1	U2	U3
Kontrol						
C5;T24						
C10;T24						
C15;T24						
C5;T48						
C10;T48						
C15;T48						

Pengujian tahap kedua yaitu dilakukan produksi biosurfaktan yang dihasilkan dari penanaman *Bacillus sp* pada media molasses pada tahap pertama. Konsentrasi molasses pada media dipilih berdasarkan hasil uji aktivitas emulsi dan uji *Drop collapse*. Lalu dilakukan aplikasi biosurfaktan terhadap limbah cair rumah potong ayam. Efektivitas diuji dengan menggunakan 4 kategori konsentrasi dan 3 lama waktu inkubasi untuk mengetahui konsentrasi dan waktu inkubasi terbaik dalam mempengaruhi kadar TSS, Lemak, dan pH limbah cair RPA, yaitu : perlakuan 1 kontrol negatif konsentrasi 0% yaitu limbah 100%, perlakuan 2 konsentrasi 10%, perlakuan 3 konsentrasi 20%, perlakuan 4 konsentrasi 30%. Masing-masing perlakuan dilakukan secara duplo kemudian diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C dengan 3 variabel waktu: 12, 24, dan 36 jam. Rancangan pengujian tahap kedua ditunjukkan dalam **Tabel 4.2** dengan perhitungan ulangan sebagai berikut:

Tahap 3:	$P(n-1) \geq 15$	Keterangan P= jumlah perlakuan N= jumlah ulangan yang diperlukan
	$12(n-1) \geq 15$	
	$12n-12 \geq 15$	
	$12n \geq 27$	
	$n \geq 2,25$	
	$n \geq 2$ (dibulatkan)	

(Hanafiah, 2005).

**Tabel 4.2** Rancangan penelitian tahap 2

Waktu Inkubasi	Konsentrasi biosurfaktan	Parameter yang diamati		
		TSS	Lemak	pH
12 jam	0%			
	10%			
	20%			
	30%			
24 jam	0%			
	10%			
	20%			
	30%			
36 jam	0%			
	10%			
	20%			
	30%			

#### 4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada tahap 1:

Variabel bebas : Waktu inkubasi dan konsentrasi molasses

Variabel bergantung : Emulsifikasi supernatan, *Drop collapse*

Variabel Kendali : Jumlah koloni bakteri *Bacillus sp*

Variabel yang diamati pada tahap 2:

Variabel bebas : Konsentrasi biosurfaktan *Bacillus sp* dan waktu inkubasi

Variabel bergantung : Kadar TSS, Lemak, dan pH

Variabel Kendali : Jumlah koloni bakteri *Bacillus sp*

## 4.6 Tahapan Penelitian

### 4.6.1 Persiapan Isolat Bakteri *Bacillus sp*

#### 4.6.1.1 Isolasi Bakteri

Jumlah sampel yang digunakan adalah satu isolat *Bacillus sp* dengan metode pengerjaan duplo. Isolat *Bacillus sp* diambil dari lemari penyimpanan sampel bersuhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Isolat kemudian di *thawing* dalam suhu lemari es dan suhu ruangan. Selanjutnya, isolat akan dikembangbiakan pada media NAP dan NB. Bakteri ditanaman dengan metode *streak* pada media NB (*Nutrient broth*) dan NA untuk didapatkan *stock culture* dan *fresh culture*. Menurut Barrow (2003) isolat yang tumbuh di agar miring (*fresh culture*) dilakukan karakterisasi melalui uji pewarnaan gram, katalase, oksidase, aerobik, motilitas, spora, Indol, laktosa, sukrosa dan glukosa. Kemudian dilakukan uji hemolisis dengan cara penanaman bakteri pada media agar darah untuk menunjukkan bakteri tersebut mampu menghasilkan biosurfaktan (Thavasi, *et al.*, 2011).

#### 4.6.1.2 Penentuan Kurva Pertumbuhan *Bacillus sp*

Pembuatan kurva pertumbuhan yaitu untuk mengetahui waktu inokulasi bakteri mencapai fase *stasioner*. Pengamatan pertumbuhan bakteri menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) untuk menghitung koloni bakteri pada kultur dan metode kerapatan optik (*Optical Density/ OD*) yang berdasarkan metode Cappucino dan Sherman (2005). TPC dilakukan setiap dua jam sekali dan dinyatakan sebagai hasil logaritmik dari jumlah sel/ml kultur, dan pengukuran *Optical Density* juga dilakukan setiap dua jam sekali.

Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri (lampiran 4).

#### 4.6.2 Produksi Biosurfaktan

Optimasi media menggunakan molasses sebagai sumber nutrisi dengan 3 macam konsentrasi. Penentuan konsentrasi molasses berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Shabeb pada tahun 2010 yang dimodifikasi yaitu P1 5% molasses dengan 95% NB, P2 10% molasses dengan 90% NB, dan P3 15% molasses dengan 85% NB, masing-masing kelompok perlakuan dilakukan secara duplo kemudian ditambahkan 3 ml suspensi bakteri *Bacillus sp* fase stasioner dari NB. Setelah itu dilakukan inkubasi menggunakan inkubator goyang dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 30° C selama 24 dan 48 jam. Setelah diinkubasi, kultur di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4° C. Selanjutnya supernatan diisolasi sebagai biosurfaktan (Plaza *et al*, 2013).

#### 4.6.3 Pengukuran Kualitas Biosurfaktan

Uji kualitas biosurfaktan menggunakan dua metode yaitu :

a. Uji *drop collapse* (*Drop Collapse Test*)

Isolat *Bacillus sp* ditanam pada median *nutrient broth* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam selanjutnya disentrifugasi. Supernatan ditetaskan di atas cawan petri yang sudah dilapisi minyak 0.1 ml. Pecahnya lapisan minyak pada permukaan cawan petri tersebut menunjukkan adanya aktivitas biosurfaktan. (Mahalingam dan Nithya, 2014).

b. Uji Aktivitas Emulsi

Aktivitas emulsi diukur dengan cara menambahkan 4,5 ml supernatan dengan 0,5 ml hidrokarbon uji (n-hexadekan). Setelah itu divortek selama 1 menit. Campuran tersebut diukur kestabilan emulsinya dengan mengukur nilai absorbansi campuran sebelum dan setelah inkubasi pada suhu ruang tiap 30 menit selama 2 jam, pada panjang gelombang 610 nm. Kontrol negatif terdiri dari air mineral steril dan minimal media sebagai blanko absorbansi. Aktivitas emulsifikasi dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 3 ulangan (Riffiani, 2016).

Aktivitas emulsi juga diukur dengan menghitung index emulsinya dengan cara 1 ml n-hexadekan ditambahkan pada 800  $\mu$ l biosurfaktan dan divortex selama 2 menit. Tabung dидiamkan selama 2 jam untuk menyetabilkan emusinya dan index emulsi diukur dengan menghitung :

$$E = [\text{tinggi lapisan emulsi (mm)} / \text{tinggi total cairan (mm)}] \times 100.$$

Pengukuran dilakukan pada menit ke-0 dan setiap 30 menit selama 2 jam (Alvarez, *at al.*, 2015).

#### 4.6.4 Produksi Biosurfaktan

3 ml suspensi bakteri *Bacillus sp* fase stasioner yang ditanam pada meda NB ditambahkan pada media NMB (*nutrien molasses broth*) dengan konsentrasi molasses terbaik, perlakuan dilakukan secara duplo. Setelah itu dilakukan inkubasi menggunakan inkubator goyang dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 30° C selama 24 dan 48 jam. Setelah diinkubasi, kultur di



sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4° C. Selanjutnya supernatan diisolasi sebagai biosurfaktan (Plaza *et al*, 2013).

#### 4.6.5 Pengukuran Efektifitas Biosurfaktan

Biosurfaktan yang diuji diambil dari supernatan terbaik melalui pengukuran kualitas biosurfaktan. Efektivitasnya diuji dengan menggunakan 4 macam konsentrasi berdasarkan penelitian Putra pada tahun 2013 yang dimodifikasi, yaitu perlakuan 1 kontrol negatif konsentrasi 0% yaitu limbah 100%, perlakuan 2 konsentrasi 10%, perlakuan 3 konsentrasi 20%, perlakuan 4 konsentrasi 30%. Masing-masing perlakuan dilakukan secara duplo kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 30° C dengan 3 variabel waktu yaitu 12, 24 dan 36 jam.

##### 4.6.5.1 Uji Kadar *Total Suspended Solid* (TSS)

Pengujian TSS dilakukan dengan metode *gravimetri*. Menurut SNI 06-6989.3-2004 cara uji padatan tersuspensi total (TSS) secara *gravimetri* yaitu dengan cara sebagai berikut :

1. Dilakukan penyaringan dengan peralatan vakum. Basahi saringan dengan sedikit air suling. Saringan yang digunakan memiliki pori-pori sebesar 0,45  $\mu\text{m}$ .
2. Dilakukan pengadukan contoh uji dengan pengaduk magnetik untuk memperoleh contoh uji yang lebih homogen.
3. Dipipet contoh uji dengan volume tertentu, pada waktu contoh diaduk dengan pengaduk magnetik.

4. Dilakukan pencucian kertas saring dengan 3 x 10 mL air suling, biarkan kering sempurna, dan dilanjutkan penyaringan dengan vakum selama 3 menit agar diperoleh penyaringan sempurna. Contoh uji dengan padatan terlarut yang tinggi memerlukan pencucian tambahan.
5. Kertas saring dipindahkan secara hati-hati dari peralatan penyaringan dan pindahkan ke wadah timbang aluminium sebagai penyangga.
6. Dilakukan pengeringan dalam oven setidaknya selama 1 jam pada suhu 103°C sampai dengan 105°C, dinginkan dalam desikator untuk menyeimbangkan suhu dan timbang.
7. Diulangi tahapan pengeringan, pendinginan dalam desikator, dan lakukan penimbangan sampai diperoleh berat konstan atau sampai perubahan berat lebih kecil dari 4% terhadap penimbangan sebelumnya atau lebih kecil dari 0,5 mg. Berdasarkan peraturan pemerintah nomor 02 tahun 2011, kadar TSS maksimal pada limbah cair rumah potong ayam yang diizinkan adalah sebesar 100 mg/L.

#### 4.6.5.2 Uji Kadar Lemak

Lemak dalam uji ini menggunakan metode ekstraksi *gravimetri*.

Menurut SNI 06-6989.10-2004 cara uji kadar lemak secara *gravimetri* adalah sebagai berikut :

1. Analisis gravimetri adalah cara analisis kuantitatif berdasarkan berat tetap (berat konstan). Pada penentuan lemak dengan metode gravimetri ini, dilakukan juga proses ekstraksi dan destilasi vakum untuk memisahkan

- lemak yang terdapat dalam sampel sehingga dapat diketahui berat lemak dalam sampel.
2. Erlenmeyer yang digunakan untuk menampung hasil ekstraksi sampel, dipanaskan di dalam oven terlebih dahulu pada suhu 103-105°C untuk menghilangkan air.
  3. Setelah pemanasan, Erlenmeyer dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit.
  4. Penimbangan Erlenmeyer dilakukan pada neraca analitis untuk didapatkan berat Erlenmeyer kosong. Erlenmeyer dikonstankan beratnya dengan pemanasan dan penimbangan ulang hingga diperoleh berat konstan (perbedaan berat maksimal sebesar 2mg).
  5. Pemisahan lemak dari sampel air dilakukan dengan proses ekstraksi dalam corong pisah, dimana sampel ditambahkan HCl 1:1 hingga pH 2 dan kemudian ditambahkan petroleum eter, lalu diekstraksi. Penambahan HCl 1:1 bertujuan untuk memberikan suasana asam pada sampel air dimana pada suasana asam, lemak dapat larut pada pelarutnya. Petroleum eter yang ditambahkan bertindak sebagai pelarut dari lemak yang akan dipisahkan dari sampel air.
  6. Proses ekstraksi dilakukan untuk mendistribusikan lemak dari sampel air ke dalam pelarut petroleum eter. Ketika proses ekstraksi, sesekali kran pada corong pisah dibuka untuk mengeluarkan gas yang dihasilkan dari proses ekstraksi. Setelah itu corong pisah didiamkan selama 10 menit untuk menghilangkan emulsi.

7. Setelah didiamkan, akan terbentuk 2 lapisan dimana lapisan atas merupakan petroleum eter yang berikatan dengan lemak dan lapisan bawah merupakan air.
8. Lapisan bawah dikeluarkan dan ditampung pada gelas kimia dan lapisan atas ditampung pada Erlenmeyer asah untuk analisis selanjutnya.
9. Sebanyak 30 mL petroleum eter dimasukkan ke dalam corong pisah untuk membilas sisa sampel dan dikhawatirkan masih terdapat lemak yang menempel pada dinding corong pisah.
10. Sari petroleum eter dalam erlenmeyer kemudian dipanaskan menggunakan evaporator pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ . Dengan menggunakan evaporator, pelarut petroleum eter akan dipisahkan dari lemak yang terlarut di dalamnya dengan cara menguapkan petroleum eter sehingga tersisa lemak pada labu erlenmeyer.
11. Labu Erlenmeyer kemudian dipanaskan di dalam oven pada suhu  $103-105^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam untuk menguapkan air.
12. Labu Erlenmeyer selanjutnya didinginkan di dalam desikator selama 30 menit.
13. Labu Erlenmeyer ditimbang pada neraca analitis untuk mendapatkan berat Erlenmeyer yang berisi lemak.
14. Erlenmeyer dikonstantkan beratnya dengan pemanasan dan penimbangan ulang hingga diperoleh berat konstan (perbedaan berat maksimal sebesar 2 mg). Kadar lemak dapat dihitung berdasarkan data yang diperoleh. Berdasarkan peraturan pemerintah nomor 02 tahun 2011, kadar lemak

maksimal pada limbah cair rumah potong ayam yang diizinkan adalah sebesar 15 mg/L.

#### 4.6.5.3 Uji Nilai pH

Pengukuran nilai pH dilakukan menggunakan pH meter. Langkah pengukurannya yaitu ujung elektroda dicuci dengan air suling dan dilap dengan tissue sampai kering. Kemudian elektroda dimasukkan ke dalam sampel air limbah. Tekan tombol untuk mengaktifkan alat pH meter. Set temperatur dan tekan angka temperatur yang diinginkan/ sesuai temperatur sampel. Angka pH dibaca setelah pH meter menunjukkan "Ready". Kemudian dicatat nilai pH yang muncul. Berdasarkan peraturan pemerintah nomor 02 tahun 2011, kadar pH maksimal pada limbah cair rumah potong ayam yang diizinkan adalah pH sebesar 6-9.

#### 4.7 Analisis Data

Data kualitatif yang diperoleh dari hasil penelitian ditabulasi menggunakan *Microsoft Office Excel 2010* dan dianalisis menggunakan fasilitas *Minitab 17 for windows* dengan analisis Rancangan Acak Kelompok Faktorial. Apabila terdapat perbedaan nyata uji dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Turkey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Data efektifitas biosurfaktan asal bakteri *Bacillus sp.* pada limbah cair RPA ditentukan dengan pengamatan perubahan kadar *Total Suspended Solid* (TSS), kadar lemak, dan nilai pH.