

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Februari 2016 sampai Mei 2016.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu adalah kompor listrik “Oxone”, Petridish “Duran”, botol media 250ml “Duran”, gelas ukur “Pyrex”, tabung erlenmeyer 250ml “Duran”, autoklaf “All american”, *beaker glass* 1000ml “Pyrex”, mikroskop “Olympus BX 41”, mikropipet “Vitlab”, timbangan “Ohaus”, tabung reaksi “Iwaki”, labu pengenceran 100ml “Pyrex”, rak tabung reaksi, gelas uji, spatula, bunsen, panci, pipet tetes, pisau, gunting, korek api, jarum ose, stik L, *handsprayer*, *object glass*, *cover glass* ukuran 18 x 18 mm, *orbital shakers* “Protech model 722”, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), dan kamera digital “Sony H300”, kertas *whatman* 0,45 μm , *centrifuge* “Hettich EBA20S”, pH meter “WalkLAB”, spektrofotometer UV - 1800 “SHIMADZU” (OD) dan spektrofotometer UV “spectroquant pharo 300” (Pb).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu limbah tebu molase, bagasse, dan blotong, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, HNO_3 , reagen timbal, pepton, dextrose, glukosa, *yeast ekstrak powder*, *alluminium foil*, *wrapping*, antibiotik (*chloramphenicol*), agar, aquadest steril, alkohol 70 %, spirtus, kertas label, buku identifikasi khamir.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian terdiri dari beberapa tahapan: (1) pembuatan media isolasi dan media uji pertumbuhan khamir pada media cair (2) isolasi khamir pada limbah tebu (3) uji pertumbuhan khamir pada media cair (4) pembuatan suspensi khamir (5) uji bioremediasi isolat khamir terhadap unsur Pb.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pembuatan Media Isolasi dan Media Uji

Media isolasi khamir menggunakan media agar *Yeast Ekstrak Pepton Dextrose* (YEPD) yang dicemari larutan Pb. Media agar YEPD termasuk media selektif untuk jenis khamir, untuk membuat 1000 ml media YEPD, diperlukan 2 gram glukosa, 5 gram pepton, 10 gram *yeast extract powder*, 15 gram agar, 1000 ml aquadest dan 2 kapsul *chloramphenicol*. Cara pembuatan media dilaksanakan dengan mendidihkan aquadest bersamaan dengan semua bahan kecuali agar dan *chloramphenicol*. Agar dimasukkan setelah air mendidih dan diaduk hingga merata kemudian ditambah *chloramphenicol*. Media jadi dimasukkan ke dalam botol media dan distrikan menggunakan autoclaf suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Selanjutnya media agar YEPD sebanyak 15-17 ml dituangkan kedalam cawan petri ditambah 1 ml larutan Pb 1 ppm. Inkubasi 24 jam pada suhu ruangan (Rehman, 2009).

Media uji pertumbuhan khamir pada media cair digunakan media SB (*Saboroud Broth*) yaitu diperlukan 10 gram dextrose dan 20 gram pepton yang dilarutkan pada 1 liter aquadest steril, larutan dipanaskan hingga mendidih dan bahan larut sempurna. media yang sudah homogen dimasukan ke botol media, disterilkan menggunakan autoklaf suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.4.2 Isolasi Khamir pada Limbah Tebu

1. Isolasi Khamir

Isolasi khamir diperoleh dari limbah tebu dari jenis bagasse, blotong dan molase. Isolasi dilaksanakan menggunakan metode *Dilution Plate*. Suspensi dibuat dari 10 gram sampel limbah padat atau 10 ml limbah cair kemudian di larutkan pada 90 ml aquadest selanjutnya dihomogenkan menggunakan *orbital shaker* kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Selajutnya suspensi diencerkan bekala pada kosentrasi 10^{-1} hingga kosentrasi 10^{-5} . Suspensi limbah pada pengenceran seri 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} diambil sebanyak $30\mu\text{l}$ dibiakan pada media YEPD yang telah dicemari pb 1

ppm dengan metode *spread plate* dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruangan untuk dilakukan pemurnian (Nugroho, 2013 dan Rehman, 2009).

2. Perhitungan Indeks Keragaman

Perhitungan indeks keragaman khamir bertujuan untuk mengetahui keragaman khamir yang berpotensi sebagai agens bioremediasi unsur Pb yaitu dengan rumus, sebagai berikut (Ludwig dan Reynold, 1988) :

$$H' = \sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{N}\right) \ln\left(\frac{n_i}{N}\right)$$

Keterangan:

H' = Indeks keragaman Shannon

S = Jumlah spesies

n_i = jumlah jenis ke- i dalam sampel total

N = jumlah individu seluruh jenis

Tabel 1. Kriteria Indeks Keanekaragaman

Nilai Keanekaragaman (H')	Kriteria
$H' < 1,0$	Keanekaragaman rendah, penyebaran jumlah individu tiap jenis rendah
$1,0 < H' \leq 3,0$	Keanekaragaman sedang, penyebaran jumlah individu tiap jenis sedang
$H' > 3,0$	Keanekaragaman tinggi, penyebaran jumlah individu tiap jenis tinggi

3. Pemurnian Khamir

Khamir yang telah tumbuh kemudian dimurnikan menggunakan metode cawan gores dengan diambil koloni tunggal dan digoreskan pada media YEPD baru menggunakan jarum ose menjadi 3 kuadran sesuai dengan hasil pembagian cawan petri. Jarum ose disterilkan menggunakan pembakar spirtus pada saat menggores dari satu kuadran ke kuadran lain. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan terbalik. Pengulangan purifikasi dilakukan sebanyak tiga kali hingga

diperoleh koloni tunggal, koloni tersebut kemudian digunakan sebagai *stock culture* (Benson, 2001).

4. Identifikasi khamir

Isolat khamir diidentifikasi sampai tingkat genus dengan mengacu pada buku panduan identifikasi "*The Yeasts a Taxonomic Study*" dan pustaka lainnya. Identifikasi dilakukan dengan mengamati kenampakan khamir secara makroskopis dan secara mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis meliputi kenampakan koloni khamir pada petridish yang berupa bentuk, warna, tekstur, tepi koloni dan elevasi koloni khamir. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan mengambil koloni khamir dan diletakkan di atas *object glass*. Selanjutnya ditutup dengan *cover glass*, kemudian di *squash* dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam koloni yang ada pada kaca preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Identifikasi mikroskopik dilakukan dengan mengamati kenampakan khamir di mikroskop yang meliputi bentuk sel, ukuran sel, jumlah intisel, pola pertunasan dan keberadaan pseudohifa.

3.4.3 Uji Pertumbuhan Khamir pada Media Cair

Uji pertumbuhan khamir pada media cair ditujukan untuk mengetahui cara kerja khamir yang bersifat fermentatif atau oksidatif pada media cair SB. Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan khamir pada media SB. Sebanyak satu ose isolat khamir yang berumur 24 jam dimasukkan kedalam 10 ml media SB dan ditumbuhkan selama 1x24 jam. Khamir yang bersifat oksidatif pada media SB akan membentuk lapisan (film) atau pelikel pada permukaan media, sedangkan khamir yang bersifat fermentatif akan membentuk pelikel pada dasar media (Jumiyati *et al*, 2012).

3.4.4 Pembuatan Suspensi Khamir

Pembuatan suspensi khamir dilakukan secara aseptis, yaitu sebanyak satu ose isolat khamir yang berumur 24 jam dimasukan pada 10 ml media SB, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 x 24 jam. Selanjutnya dilakukan penyamaan massa (OD = 1) dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

3.4.5 Uji Bioremediasi Isolat Khamir terhadap unsur Pb

Pengujian Isolat khamir bertujuan untuk mengetahui potensi khamir dalam menurunkan unsur Pb 10 ppm. Bahan yang digunakan yaitu, 1 liter aquades steril dan $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1,6 gr. Pembuatan larutan Pb 10 ppm dengan dibuat larutan stok pb 1000 ppm terlebih dahulu, yaitu dengan memasukan $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1,6 gr kedalam 1 liter aquades, dihomogenkan dengan sendok pengaduk kemudian diencerkan hingga 10 ppm dengan dipipet 1 ml larutan stok dan dimasukkan pada larutan aquades 100 ml pada labu reaksi 100 ml. Setelah itu diambil 50 ml larutan pb 10 ppm diukur nilai kadar Pb awal menggunakan spektrofotometer. Hasil konsentrasi awal ini yang digunakan untuk melihat penurunan kadar Pb setelah proses bioremediasi oleh isolat khamir. Selain itu dilakukan pengamatan parameter lainnya yaitu derajat keasaman dan perubahan fisik seperti derajat kekeruhan *optical density* (OD) dan kenampakan fisik meliputi aroma, uap air, endapan dan kekeruhan.

Media yang digunakan untuk perlakuan sebanyak 50 ml larutan Pb 10 ppm dituangkan dalam botol uji, selanjutnya kultur khamir disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 3 menit. Suspensi khamir dipipet 1 ml dituangkan kedalam media larutan Pb ditambah 5% media SB sebagai sumber nutrisi. Selanjutnya inkubasi pada *orbital shakers* dengan kecepatan 120 rpm selama 2 hari. Setelah proses bioremediasi selama 2 hari dilakukan analisis kandungan Pb akhir, pengukuran pH akhir, dan perubahan fisik seperti nilai OD dan kenampakan fisik akhir meliputi ada atau tidaknya aroma, uap air, endapan dan perubahan kekeruhan setelah proses bioremediasi (Rehman, 2009 dan Nugroho, 2013).

3.4.6 Pengukuran Pb, Pengukuran pH dan Pengamatan Perubahan Fisik

1. Pengukuran Kandungan Pb

Metode analisis kandungan Pb pada sampel cair menggunakan spektrofotometer-UV, prinsipnya analit logam pada cairan diubah menjadi bentuk warna pekatan menggunakan reagen timbal hitam. Prosedur pengukuran Pb menggunakan spektrofotometer - UV sebagai berikut :

- 1) Larutan hasil uji timbal terlarut disaring dengan kertas whatman 0,45 μm dan ditambahkan 1 ml HNO_3 1 M pekat untuk memutus ikatan logam dan menghentikan reaksi mikroba.
- 2) Diambil larutan sebanyak 5 ml dan dipindahkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambah 5 tetes Reagen Pb-1K dihomogenkan dan diamkan selama 1 menit hingga terbentuk warna merah.
- 3) Hasil larutan selanjutnya dimasukan 1 sendok takar Reagen Pb-2K, dikocok hingga homogen dan didiamkan selama 1 menit hingga terbentuk warna ungu. Setelah itu diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540-560 nm
- 4) Kadar logam Pb dihitung dengan rumus :

$$\text{Pb (mg/L)} = C \times \text{fp}$$

Keterangan :

C : kadar yang didapat dari hasil pengukuran, dinyatakan dalam milligram per-liter (mg/L).

fp : faktor pengenceran

(Berdasarkan komunikasi pribadi dengan Analis Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang).

2. Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan pada awal dan akhir pengujian, alat yang digunakan adalah pH meter, dengan prosedur pengukuran sebagai berikut :

- 1) pH meter dihidupkan.
- 2) pH meter kedalam air sampel selama 2 menit.
- 3) Nilai yang muncul pada pH meter dicatat.

3. Pengamatan Perubahan Fisik

Pengamatan perubahan fisik dilakukan sebelum dan setelah proses pengujian secara deskriptif oleh dua orang. Pengamatan perubahan fisik dengan mengukur nilai OD serta kenampakan fisik meliputi ada atau tidaknya aroma, uap air, endapan dan perubahan kekeruhan setelah proses bioremediasi (Nugroho, 2013).

3.5 Analisis Data

Data pada penelitian ini disusun berdasarkan hasil eksplorasi khamir pada limbah tebu dengan penyajian data khamir hasil eksplorasi dan uji bioremediasi secara deskriptif yang terdiri dari delapan perlakuan dengan tiga ulangan.

