

**PENGARUH PEMBERIAN BIOSURFAKTAN ASAL *Pseudomonas* sp.
MEDIA LIMBAH MINYAK GORENG TERHADAP KADAR TOTAL
SUSPENDED SOLIDS (TSS) DAN LEMAK PADA LIMBAH CAIR
RUMAH POTONG AYAM (RPA) TRADISIONAL**

SKRIPSI

**Oleh :
IBNUL RIFA'IDANO
0911313025**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN BIOSURFAKTAN ASAL *Pseudomonas* sp.
MEDIA LIMBAH MINYAK GORENG TERHADAP KADAR *TOTAL
SUSPENDED SOLIDS* (TSS) DAN LEMAK PADA LIMBAH CAIR
RUMAH POTONG AYAM (RPA) TRADISIONAL**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

IBNUL RIFA'I DANO

0911313025



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN BIOSURFAKTAN ASAL *Pseudomonas sp.* MEDIA LIMBAH MINYAK GORENG TERHADAP KADAR *TOTAL SUSPENDED SOLIDS* (TSS) DAN LEMAK PADA LIMBAH CAIR RUMAH POTONG AYAM (RPA) TRADISIONAL

Oleh :
IBNUL RIFA'I DANO
0911313025

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 29 November 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Drh.Masdiana C. Padaga M.App.Sc
NIP. 19560210 198403 2 001

Drh. Dyah Ayu Oktavianie A. P.,M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter
Hewan Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ibnul Rifa'i Dano

NIM : 0911313025

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

“Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Asal *Pseudomonas sp.* Media Limbah Minyak Goreng Terhadap Kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan Lemak Pada Limbah Cair Rumah Potong Ayam (RPA) Tradisional”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 November 2013

Yang menyatakan,

(Ibnul Rifa'i Dano)

NIM. 0911313025

Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Asal *Pseudomonas sp.* Media Limbah Minyak Goreng Terhadap Kadar *Total Suspended Solids* (TSS) dan Lemak Pada Limbah Cair Rumah Potong Ayam (RPA) Tradisional

ABSTRAK

Rumah Potong Ayam (RPA) merupakan industri peternakan yang memiliki peran penting dalam mencukupi kebutuhan protein hewani masyarakat, tetapi berdampak negatif menimbulkan limbah yang mencemari lingkungan jika tidak dilakukan penanganan limbah dengan benar. Limbah dapat ditangani dengan bahan surfaktan sintesis maupun berasal dari mikroorganisme yang disebut biosurfaktan. *Pseudomonas sp.* merupakan mikroorganisme penghasil biosurfaktan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* yang ditumbuhkan pada limbah minyak goreng dan pengaruhnya terhadap kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan lemak pada bioremediasi limbah cair RPA tradisional. Biosurfaktan diproduksi menggunakan media limbah minyak goreng dengan variasi konsentrasi (0%, 10%, 20%, 30% dan 40%) dan variasi waktu inkubasi (24 jam, 48 jam, 72 jam) dan diuji kualitasnya dengan uji *drop collapse* dan uji emulsifikasi. Pengujian biosurfaktan pada limbah cair RPA dengan variasi konsentrasi biosurfaktan (0%, 10%, 20%, 30%) dan variasi waktu inkubasi (24 jam dan 48 jam), dan dilakukan pengamatan terhadap penurunan kadar TSS dan lemak pada limbah cair RPA dengan metode gravimetri. Hasil penelitian menunjukkan biosurfaktan terbaik asal *Pseudomonas sp.* dihasilkan pada konsentrasi limbah minyak goreng 30% dan lama inkubasi 48 jam dengan nilai emulsifikasi sebesar 0,6 dan mampu menurunkan tegangan permukaan selama 1 detik. Biosurfaktan tersebut mampu menurunkan kadar TSS sebesar 0,013% dari kontrol 0,032% sedangkan kadar lemak sebesar 0,025% jika dibandingkan dengan kontrol sebesar 0,036%.

Kata kunci : biosurfaktan, limbah minyak goreng, *Pseudomonas sp.*, *total suspended solids* (TSS), lemak

Effect of Biosurfactant origins *Pseudomonas sp.* Waste of Cooking Oil Media to the *Total Suspended Solids* (TSS) and Fat Levels in Liquid Waste of Traditional Poultry Slaughterhouse

ABSTRACT

Poultry Slaughterhouse is a livestock industry that has an important role to fulfill animal protein for the community, but the negative impacts can lead to environmental pollution if not handling properly. Waste material can be treated with synthetic surfactant or surfactant from a microorganism which called biosurfactants *Pseudomonas sp.* is biosurfactant producing microorganisms. The aim of this study was to determine the potential of biosurfactan origins from *Pseudomonas sp.* and its effect on levels of Total Suspended Solid (TSS) and fat level in traditional poultry slaughterhouse liquid waste bioremediation. Biosurfactant were produced by using waste of cooking oil media with variation of concentration, that were (0%, 10 %, 20 %, 30 % and 40 %) and variation of the incubation time were (24 h, 48 h, 72 h) that tested then by drop collaps test and emulsification test. Testing biosurfactant on slaughterhouse liquid waste with variations of biosurfactant concentration (0%, 10%, 20% and 30%) and incubation periods 24 h and 48 h and carried out observations of decreased levels of TSS and fats on liquid waste with the gravimetry methods. The results showed that the best biosurfactant were produced on the 30% concentration of cooking oil waste and in 48 hour incubation with emulsification value 0.6 and was able to low the surface tension on 1 second. Biosurfactant origins from *Pseudomonas sp.* could reduce TSS levels at 0.013% from 0.032% of control and lipid levels at 0.025% compared to control 0.036%.

Keyword : Biosurfactan, Waste of cooking oil, *Pseudomonas sp.*, *Total Suspended Solids* (TSS), Fat

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas ridho, limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **"Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Asal *Pseudomonas* sp. Media Limbah Minyak Goreng Terhadap Kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan Lemak Pada Limbah Cair Rumah Potong Ayam (RPA) Tradisional** dengan lancar. Selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan laporan ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. drh. Masdiana C. Padaga M.App.Sc dan drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P. M.Biotech selaku dosen pembimbing atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas, waktu serta seluruh motivasi yang telah diberikan selama ini.
2. Dr. Dra. Herawati, MP dan Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc selaku dosen penguji yang banyak memberikan arahan dan masukan selama ini.
3. Prof. Dr. Aulanni'am selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan PKH UB atas pengarahan, motivasi serta dukungan yang selalu diberikan kepada mahasiswa PKH UB terutama penulis selama ini.
4. Dr. Agung Pramana Warih, M., MS selaku Dosen Penasehat Akademik sekaligus Ketua Program Kedokteran Hewan yang telah sabar memberi pengarahan dan motivasi selama masa studi di PKHUB.

5. Seluruh jajaran dekanat, dosen dan staff Program Kedokteran Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
6. Ibunda Sri Andaningsih, Kakanda M. Idham Dano serta Adinda tercinta Sari Devi Dano, untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi yang telah diberikan selama ini.
7. Ken Ranisa Kusuma atas semua bantuan, dukungan dan pengorbanan yang telah diberikan kepada penulis selama dua tahun ini, semoga Allah SWT membalas segala kebaikan dan pengorbanannya.
8. Tim Biosurfaktan PKH UB dari generasi ke generasi yaitu Roosy Margaretha Riupassa, M. Hartanto Yusufa, Reza Rusandy, Luddy Ardian, Maulana Inamul Hasan, Nella Khairati, Faizal Agung Pratomo, Paura Rangga Zobda, Dimas Rizki, Farras Shanda dan M Wildan serta Mbak Ilzamha selaku *supervisor* atas perjuangan yang penuh cerita dan kenangan selama melaksanakan penelitian ini.
9. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Laboratorium Kimia Lingkungan Fakultas MIPA dan Laboratorium Kesmavet, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
10. Keluarga Besar Angkatan 2009 PKHUB atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan motivasinya yang luar biasa.

11. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan tugas akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari kata sempurna, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga Laporan Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin.

Malang, 29 November 2013

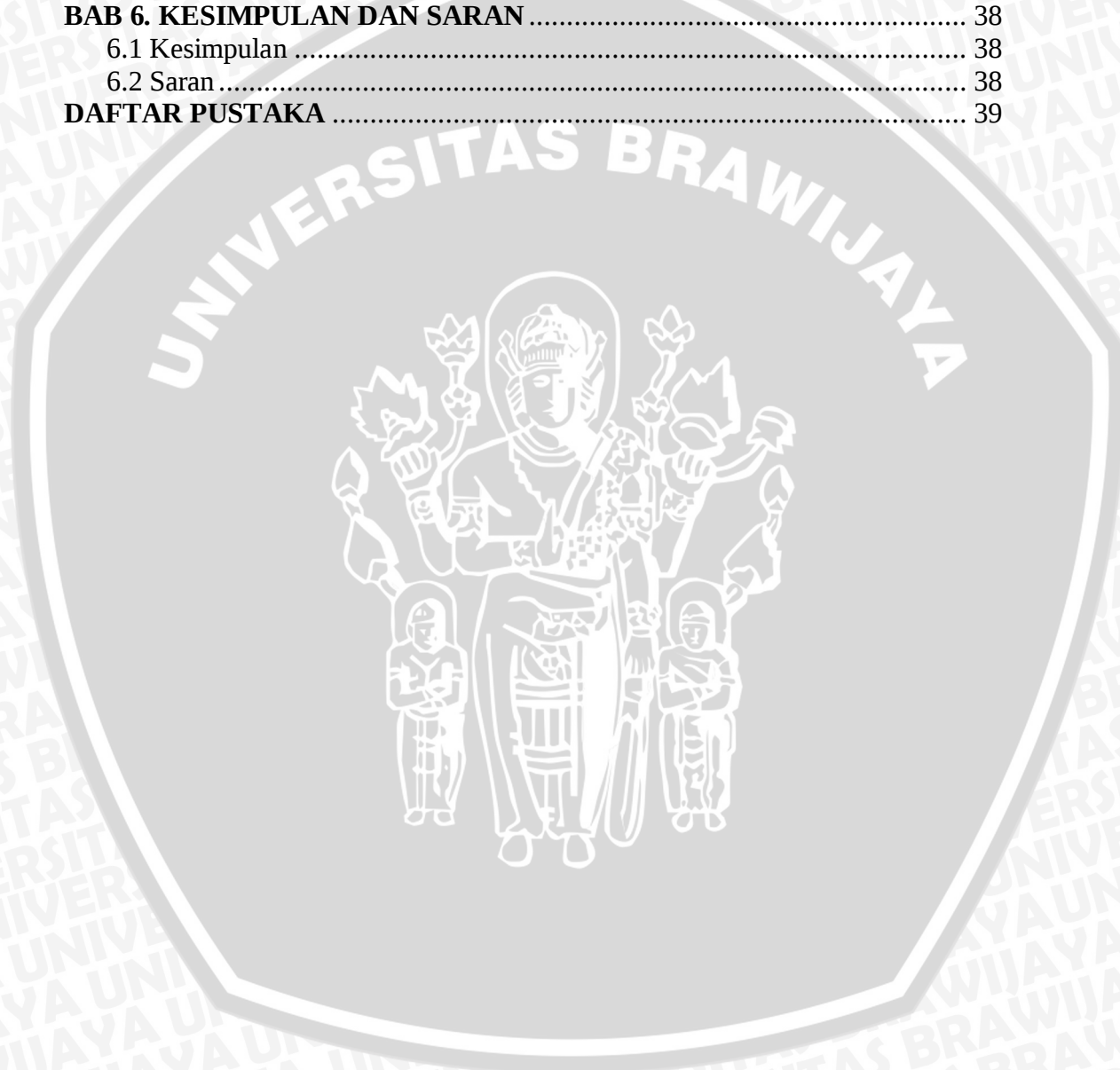
Penulis



DAFTAR ISI

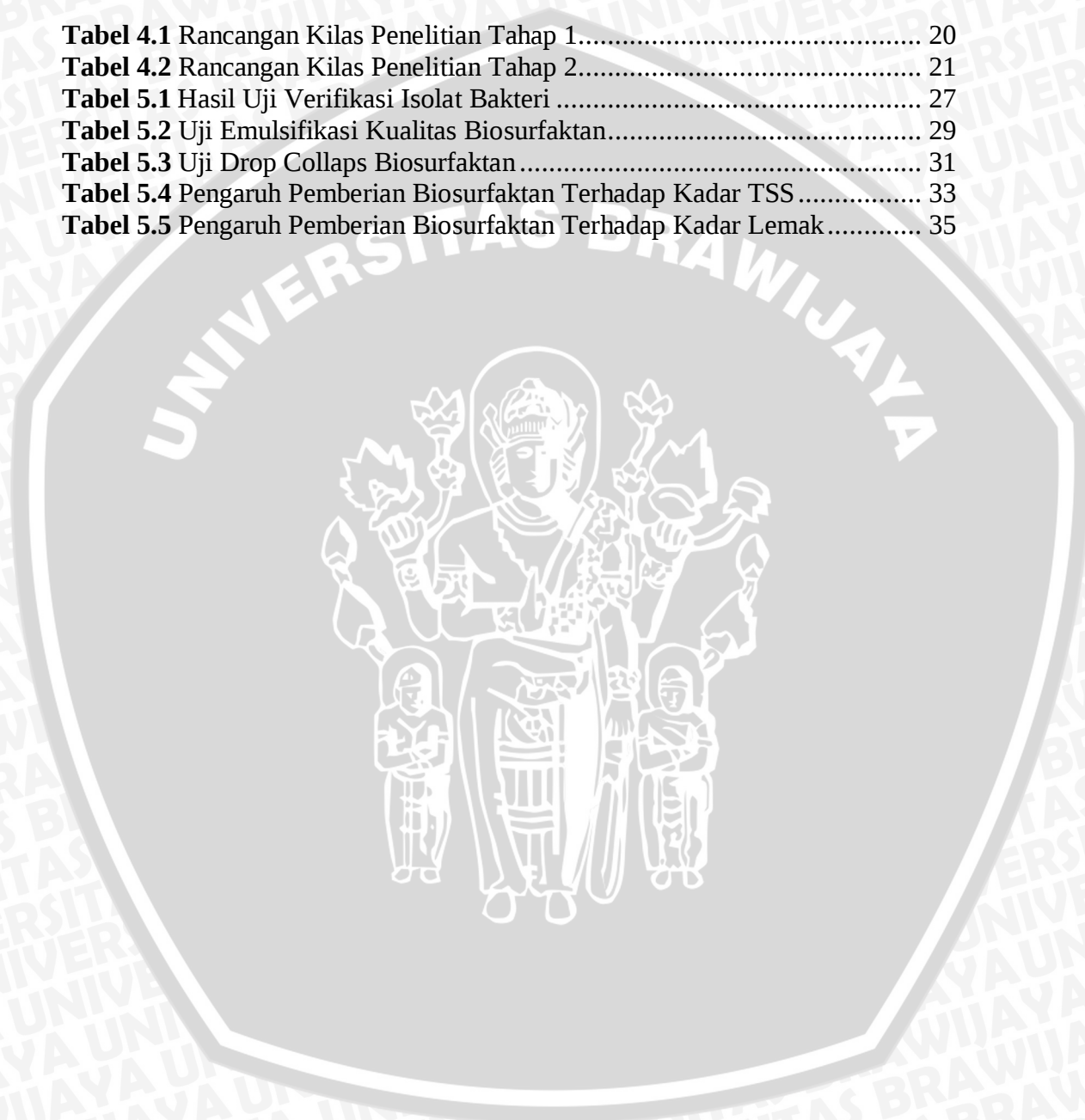
	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 RPA (Rumah Potong Ayam).....	5
2.2 Limbah Cair RPA.....	6
2.3 Biosurfaktan.....	7
2.4 Pseudomonas sp. Sebagai Penghasil Biosurfaktan.....	9
2.5 Minimum Media Limbah Minyak Goreng	10
2.6 Uji Aktifitas Biosurfaktan	12
2.6.1 Uji Drop Collaps.....	13
2.6.2 Uji Emulsifikasi	13
2.7 Uji Efektifitas Biosurfaktan Terhadap Limbah Cair RPA.....	14
2.6.1 Uji TSS.....	14
2.6.2 Uji Kadar Lemak	14
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	16
3.1 Kerangka Konseptual	16
3.2 Hipotesa Penelitian.....	17
BAB 4. METODE PENELITIAN	18
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	18
4.2 Sampel Penelitian.....	18
4.3 Alat dan Bahan.....	18
4.4 Rancangan Penelitian	19
4.5 Variabel Penelitian	21
4.6 Tahapan Penelitian	21
4.6.1 Persiapan Isolat Bakteri.....	21
4.6.2 Produksi Biosurfaktan.....	22
4.6.3 Pengukuran Kualitas Biosurfaktan.....	23
4.6.4 Efektifitas Biosurfaktan Limbah Cair RPA	24
4.6.5 Uji Efektifitas Biosurfaktan Pada Limbah Cair RPA	24

4.5 Analisa Data.....	26
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
5.1 Isolat Pseudomonas sp.	27
5.2 Uji Kualitas Biosurfaktan dengan Metode Emulsifikasi.....	29
5.3 Uji Kualitas Biosurfaktan dengan Metode Drops collaps	31
5.4 Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Terhadap Kadar TSS	33
5.5 Pengaruh pemberian Biosurfaktan Terhadap Kadar Lemak.....	35
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	38
6.1 Kesimpulan	38
6.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39



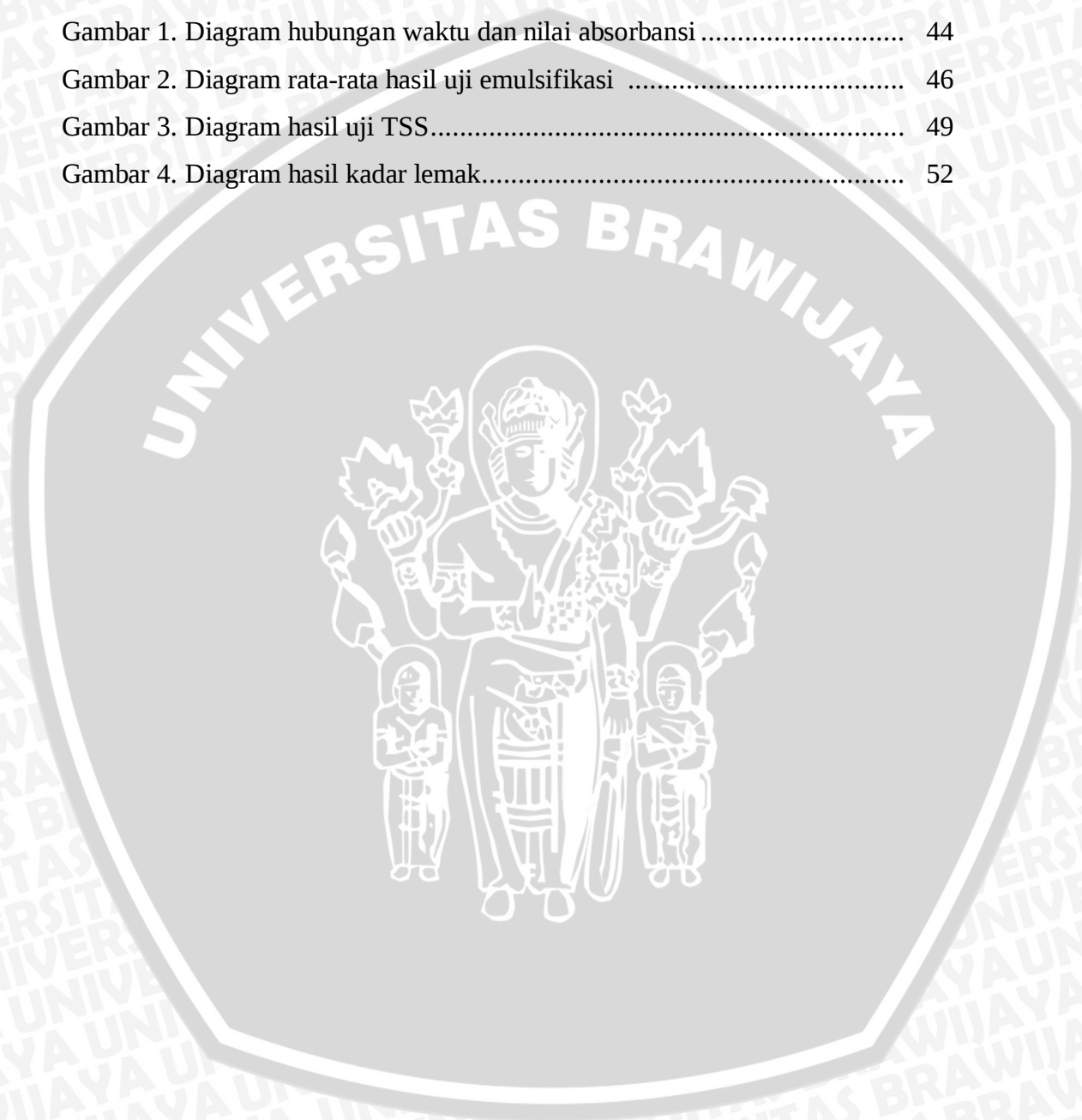
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 4.1 Rancangan Kilas Penelitian Tahap 1.....	20
Tabel 4.2 Rancangan Kilas Penelitian Tahap 2.....	21
Tabel 5.1 Hasil Uji Verifikasi Isolat Bakteri	27
Tabel 5.2 Uji Emulsifikasi Kualitas Biosurfaktan.....	29
Tabel 5.3 Uji Drop Collaps Biosurfaktan.....	31
Tabel 5.4 Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Terhadap Kadar TSS	33
Tabel 5.5 Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Terhadap Kadar Lemak.....	35



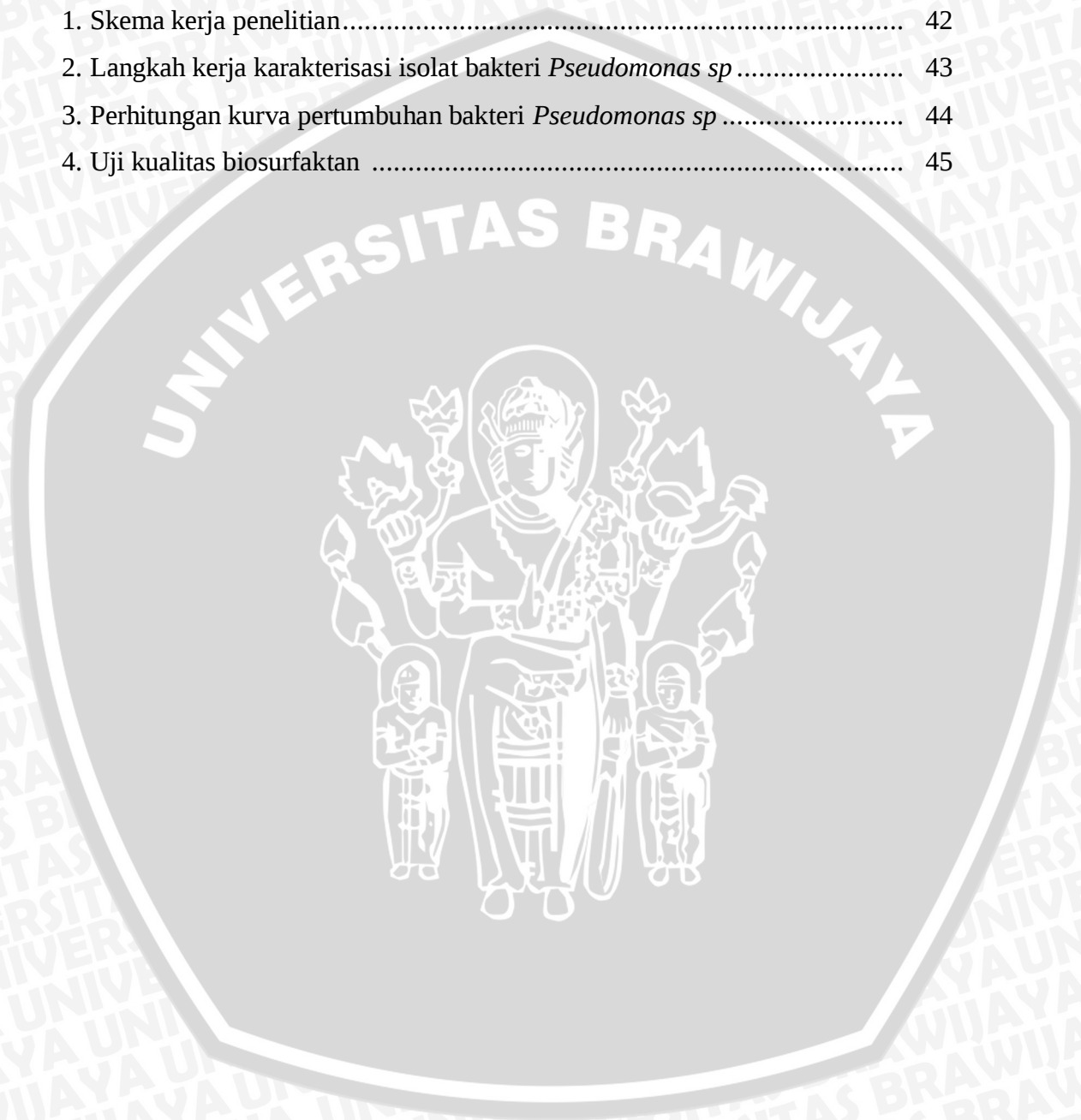
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Diagram hubungan waktu dan nilai absorbansi	44
Gambar 2. Diagram rata-rata hasil uji emulsifikasi	46
Gambar 3. Diagram hasil uji TSS.....	49
Gambar 4. Diagram hasil kadar lemak.....	52



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja penelitian.....	42
2. Langkah kerja karakterisasi isolat bakteri <i>Pseudomonas sp</i>	43
3. Perhitungan kurva pertumbuhan bakteri <i>Pseudomonas sp</i>	44
4. Uji kualitas biosurfaktan	45



DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Simbol / Singkatan

Keterangan

BNJ	beda nyata jujur
BOD	<i>biochemical oxygen demand</i>
COD	<i>chemical oxygen demand</i>
LAF	<i>laminar air flow</i>
NB	<i>nutrient broth</i>
OD	<i>optical density</i>
RAL	rancangan acak lengkap
RPA	rumah potong ayam
TPC	<i>total plate count</i>
TSS	<i>total suspended solids</i>
TSA	<i>tripton soya agar</i>





BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri pemotongan ayam di Indonesia berkembang dengan pesat sesuai dengan kemajuan perunggasan global yang mengarah kepada sasaran mencapai tingkat efisiensi usaha yang optimal. Tumbuh pesatnya industri ini selain membawa dampak positif bagi perekonomian negara, namun juga membawa dampak negatif dengan semakin banyaknya limbah yang dikeluarkan dari sisa-sisa pengolahan karkas di rumah potong ayam (RPA). Hasil dari pengolahan mengakibatkan permasalahan yang kompleks bagi lingkungan berupa penurunan kualitas lingkungan (Siwiendrayanti, 2007).

Pencemaran lingkungan menyebabkan penurunan kualitas lingkungan yang dipengaruhi limbah cair rumah potong ayam (RPA) yang mengandung bahan organik dengan konsentrasi tinggi, padatan tersuspensi, serta bahan koloid seperti lemak, protein, dan selulosa. Bahan organik ini dapat menimbulkan permasalahan lingkungan bila dibuang langsung ke lingkungan (Roihatin, 2006).

Penanganan secara biologis adalah salah satu pilihan terbaik untuk menghilangkan material organik limbah cair. Proses aerobik memiliki kecocokan untuk menghilangkan material organik. Limbah cair organik mengandung lipid dan protein yang sulit untuk didegradasi. *Bioaugmentasi* merupakan salah satu

penanganan limbah secara biologis yang memanfaatkan mikroorganisme. (Tarntip, 2011).

Pseudomonas sp. merupakan salah satu mikroorganisme yang dimanfaatkan untuk penanganan limbah secara biologis. Bakteri *Pseudomonas sp.* dapat menghasilkan biosurfaktan yang dapat dimanfaatkan untuk mengatasi berbagai pencemaran lingkungan yang disebabkan karena pencemaran senyawa hidrokarbon dan dapat menurunkan tegangan permukaan dalam cairan (Anandrajat, 2010).

Penggunaan biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* mempunyai keuntungan yaitu, mudah didegradasi, toksisitasnya rendah, dan dapat dihasilkan dari substrat yang bernilai ekonomi rendah (Kosaric, 2001). Substrat dari limbah minyak goreng merupakan salah satu minimum media pertumbuhan *Pseudomonas sp.* Penggunaan limbah minyak goreng sebagai minimum media dikarenakan limbah minyak goreng memiliki kandungan nutrisi yang rendah namun dapat menjadi sumber energi bagi pertumbuhan bakteri (Georgiou *et al.*, 2002).

Penelitian yang dilakukan sejauh ini belum memberikan informasi mengenai pemanfaatan limbah minyak goreng sebagai minimum media pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp.* sebagai penghasil biosurfaktan dan pengaruhnya pada limbah cair RPA tradisional terhadap kadar TSS dan lemak.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Bagaimanakah potensi limbah minyak goreng sebagai media pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp.* dalam menghasilkan biosurfaktan terbaik berdasarkan uji emulsifikasi dan *drop collaps*?
- 2) Bagaimanakah pengaruh pemberian biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* dengan media limbah minyak goreng dalam menurunkan kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan Lemak pada limbah cair Rumah Potong Ayam (RPA)?

1.3 Batasan Masalah

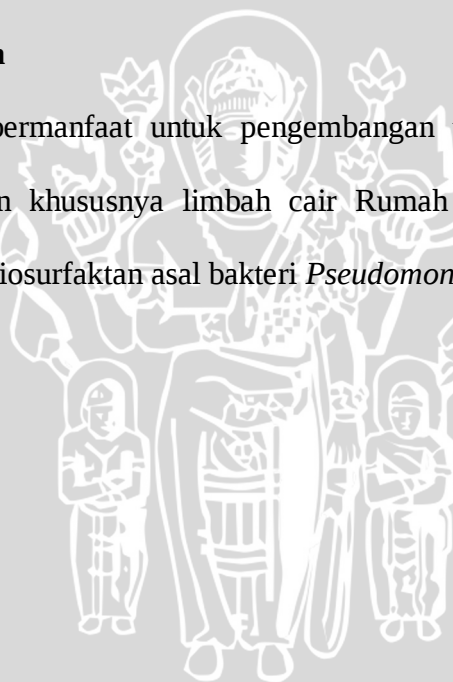
- 1) Limbah yang digunakan adalah limbah cair campuran cucian karkas dan darah pada tempat pembuangan di RPA Dinoyo.
- 2) Bakteri yang digunakan adalah isolat bakteri *Pseudomonas sp.* hasil isolasi dari penelitian Riupassa dkk (2012). yang berasal dari limbah cair RPA Dinoyo.
- 3) Minimum media produksi biosurfaktan adalah limbah minyak goreng bekas penggorengan.
- 4) Efektivitas aktivitas biosurfaktan diamati berdasarkan penentuan kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan lemak, dengan metode gravimetri dan *soxhlet* gravimetri.

1.4 Tujuan Penelitian

- 1) Mengetahui potensi limbah minyak goreng sebagai media pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp.* dalam menghasilkan biosurfaktan terbaik berdasarkan uji emulsifikasi dan *drop collaps*.
- 2) Mengetahui pengaruh pemberian biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* dengan media limbah minyak goreng dalam menurunkan kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan Lemak pada limbah cair Rumah Potong Ayam (RPA).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk pengembangan teori dalam mengatasi pencemaran lingkungan khususnya limbah cair Rumah Potong Ayam (RPA) dengan menggunakan biosurfaktan asal bakteri *Pseudomonas sp.*



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumah Potong Ayam (RPA)

Rumah Potong Unggas/Ayam (RPU/RPA) adalah kompleks bangunan dengan desain dan konstruksi khusus yang memenuhi persyaratan teknis dan *higiene* tertentu serta digunakan sebagai tempat memotong unggas/ayam bagi konsumsi masyarakat umum. Untuk membangun RPA, diperlukan persyaratan lokasi dan tersedianya sarana yang cukup memadai, hal ini tercantum dalam SNI 01-6160-1999 (SNI, 1999). Rumah Potong Ayam (RPA) merupakan salah satu industri peternakan yang memiliki peran penting dalam mencukupi kebutuhan protein hewani masyarakat. Rumah Potong Ayam berfungsi sebagai tempat pemotongan ayam hidup dan mengolah menjadi karkas ayam. Proses produksi RPA memiliki konsekuensi menghasilkan limbah baik dalam bentuk padat maupun cair (Wisnu, 2001).

Limbah adalah sisa dari suatu usaha atau kegiatan yang terdiri dari limbah berbahaya dan beracun yang merupakan sisa suatu usaha atau kegiatan yang mengandung bahan berbahaya dan beracun yang dikarenakan sifat konsentrasi atau jumlahnya, baik secara langsung maupun tidak langsung dapat mencemarkan dan merusak lingkungan hidup atau membahayakan lingkungan hidup manusia serta makhluk hidup (Wardhana, 2005). Berdasarkan sifat fisiknya limbah dapat dikategorikan atas limbah padat, cair dan gas. Limbah padat merupakan limbah yang terdiri dari padatan yang tidak terlarut contohnya kulit dan bulu. limbah cair merupakan limbah pencemar yang berbentuk cair yang susah terlarut contohnya

minyak dan lemak, sedang limbah gas adalah limbah yang mencemari udara contohnya amonia atau metana (Singgih, 2008).

2.2 Limbah Cair RPA

Dalam proses produksinya RPA menghasilkan limbah sampingan yaitu limbah padat yang meliputi jeroan dan kotoran dari usus ayam. Sedangkan limbah cair yang dihasilkan di RPA meliputi limbah cair yang berasal dari darah ayam, limbah proses pencelupan, limbah pencucian karkas ayam yang tercampur pada tempat pembuangan. Kandungan limbah cair rumah potong ayam diantaranya merupakan senyawa-senyawa kimia fisik dan mikroorganisme. Secara kimia, limbah cair mengandung *Biological Oxygen Demand* (BOD), *Chemical Oxygen Demand* (COD), *Total Suspended Solid* (TSS), serta minyak dan lemak. Secara fisik limbah cair RPA dapat dilihat tingkat kepadatan, kekeruhan, bau dan suhu. Secara mikrobiologi kandungan limbah cair rumah potong ayam diantaranya adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Lysinibacillus fusiformis* (Siwiendrayanti, 2007).

Limbah cair RPA dengan kadar COD, BOD, TSS dan lemak yang tinggi sangat berpengaruh terhadap pencemaran lingkungan sekitar RPA. Berdasarkan standar baku mutu limbah cair menurut MENLH (1995) yaitu: kadar COD sebesar 200 mg/L, BOD sebesar 100 mg/L, TSS sebesar 100 mg/L dan lemak sebesar 15 mg/L, Apabila semakin tinggi kadar COD, BOD, TSS dan lemak pada kandungan limbah cair, maka tingkat pencemaran yang akan ditimbulkan oleh limbah

tersebut akan semakin tinggi dan hal ini akan semakin berdampak buruk bagi lingkungan sekitar (Kariana, 2008).

Kandungan mikrobiologi dalam limbah rumah potong ayam diharapkan dapat dimanfaatkan untuk mendegradasi limbah yang ada di rumah potong ayam. Dalam hal ini kandungan mikrobiologi tersebut berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan yang digunakan untuk pengolahan cemaran limbah. Produksi biosurfaktan merupakan salah satu metode efektif dan aman bagi lingkungan untuk menghindari timbulnya cemaran industri melalui pengurangan limbah pada setiap tahap dari proses produksi untuk mengeliminasi limbah sebelum menyebabkan terjadinya pencemaran (Singgih, 2008).

2.3 Biosurfaktan

Surfaktan merupakan molekul yang terdiri dari gugus *hidrofobik* dan *hidrofilik* yang berada diantara permukaan fase dua zat cair dengan derajat polaritas dan ikatan hidrogen yang berbeda, misalnya permukaan antar minyak dengan air (Adamson, 2000). Surfaktan mampu mengikat molekul hidrokarbon yang tidak larut dalam air dan mampu menurunkan tegangan permukaan dan membentuk *mikroemulsifikasi* yaitu fase terdispresinya zat cair dalam bentuk globul yang terdistribusi merata ke seluruh cairan pembawanya, sehingga hidrokarbon dapat terlarut dalam air. Emulsifikasi yang terjadi dapat mempermudah degradasi hidrokarbon (Desal, 2007).

Biosurfaktan adalah zat permukaan aktif yang disintesis oleh sel hidup dan memiliki sifat-sifat mengurangi tegangan permukaan, menstabilkan emulsi,

pembentukan busa, pada umumnya tidak beracun, dan *biodegradable* (Banat, 2000). Agustiani (2008), mengemukakan bahwa biosurfaktan lebih bervariasi jenisnya dan lebih efektif untuk keperluan-keperluan yang spesifik dibandingkan dengan surfaktan sintetis.

Konsentrasi dan kualitas biosurfaktan yang dihasilkan pada setiap bakteri berbeda bergantung pada jenis bakteri dan nutrisi yang digunakannya (Guerra, *et al.* 2006). Nutrien merupakan hal yang sangat penting artinya bagi pertumbuhan mikroba termasuk bakteri penghasil biosurfaktan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa elemen makro yang memegang peranan penting dalam menunjang pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan adalah elemen karbon dan nitrogen (Horowitz, *et al.*, 2005).

Pseudomonas sp. merupakan salah satu bakteri hidrokarbonoklastik yang mampu mendegradasi berbagai jenis hidrokarbon, sehingga bakteri ini memegang peranan penting dalam pembusukan zat organik dan merupakan bakteri penghasil biosurfaktan (Guerra, *et al.*, 2006). *Pseudomonas sp.* yang diisolasi dari berbagai sumber terutama sayur, tanah, limbah hewani dan susu dapat menghasilkan senyawa yang bersifat menurunkan tegangan permukaan (Nielsen, *et al.*, 2002).

Struktur analisis biosurfaktan membuka kemungkinan untuk sintesis kimianya. Hal yang terpenting adalah diterima lingkungan karena terdegradasi dengan cepat dan mempunyai toksisitas yang rendah daripada surfaktan sintetis (Matz, *et al.*, 2001). Keuntungan biosurfaktan dibandingkan surfaktan yang disintesis secara kimia antara lain, tidak beracun, dapat diuraikan, lebih ramah lingkungan dan dapat disintesis dari bahan – bahan organik ataupun limbah

organik yang. Selain beberapa keuntungan tersebut, biosurfaktan dapat menggantikan surfaktan komersial dalam kebutuhan untuk remediasi (Camazano, *et al.*, 2003).

2.4 *Pseudomonas sp.* Sebagai Penghasil Biosurfaktan

Pseudomonas sp. merupakan bakteri hidrokarbonoklastik yaitu bakteri yang mampu mendegradasi berbagai jenis hidrokarbon, sehingga bakteri ini memegang peranan penting dalam pembusukan zat organik. *Pseudomonas sp.* merupakan bakteri gram negatif dengan sel berbentuk batang berukuran $0,5\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$, bergerak dengan flagel polar, beberapa diantaranya spesies *Pseudomonas sp.* bersifat fakultatif khemoliotrof, yaitu dapat memakai H_2 atau CO sebagai sumber karbon katalase positif. Katalase positif pada *Pseudomonas sp.* adalah enzim antioksidan yang mempercepat proses reaksi kimia dari hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Singgih, 2008).

Pseudomonas sp. memiliki kemampuan dalam metabolisme berbagai nutrisi juga mampu membentuk biosurfaktan dan dapat bertahan dan berkembang di berbagai variasi tempat seperti contohnya pada sabun, karbon, residu dan limbah (Matz, *et al.*, 2001). Menurut Fatimah (2007), dalam memproduksi biosurfaktan *Pseudomonas sp.* menggunakan karbohidrat sebagai sumber energi, yaitu karbon pada minimum media limbah minyak goreng untuk menunjang produksi biosurfaktan dalam keadaan minimum nutrisi.

Pertumbuhan *Pseudomonas sp.* pada media minyak kelapa dan tetes tebu menyebabkan selnya bersifat hidrofobik. Hidrofobisitas sel ini menyebabkan sel

tersebut menunjukkan aktivitas emulsifikasi lebih baik dan mampu menurunkan tegangan permukaan. Secara signifikan media minyak kelapa mempunyai emulsifikasi lebih baik dibanding sel yang ditumbuhkan pada media tetes tebu. Pengaruh senyawa hidrokarbon pada komponen permukaan sel yang hidrofobik dapat menyebabkan sel tersebut kehilangan integritas struktural selnya dan melepaskan biosurfaktan ke dalam medium (Quinn, 2002).

Pengujian di wilayah perairan sekitar industri menunjukkan hasil uji awal pendugaan bakteri *Pseudomonas sp.* mempunyai kemampuan hemolisis tipe β . Pendugaan terlihat dari sampel yang diuji menunjukkan adanya zona terang pada uji hemolisis. Zona bening ini merupakan indikasi awal bahwa bakteri tersebut berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan (Lin, 2006).

2.5 Minimum Media Limbah Minyak Goreng

Minyak goreng berasal dari bahan baku seperti kelapa, kelapa sawit, jagung, kedelai, biji bunga matahari dan lain-lain. Kandungan utama dari minyak goreng secara umum adalah asam lemak yang terdiri dari asam lemak jenuh (*saturated fatty acids*) misalnya asam palmitat dan asam stearate, dan asam lemak tak jenuh (*unsaturated fatty acids*) misalnya asam oleat dan asam linolenat.

Limbah minyak goreng adalah minyak goreng yang sudah digunakan berkali-kali pada proses penggorengan. Proses penggorengan berkali-kali pada suhu 200-300°C menyebabkan kandungan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang tinggi pada limbah minyak goreng. Kandungan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang tinggi mempengaruhi bakteri hidrokabonoklastik yang tumbuh pada limbah minyak

goreng yang memanfaatkan H_2O_2 sebagai sumber karbon untuk menghasilkan biosurfaktan (Ketaren, 2001).

Bakteri *Pseudomonas sp.* merupakan bakteri hidrokarbonoklastik yang dalam pertumbuhannya pada media minyak bekas penggorengan berpengaruh terhadap kualitas biosurfaktan yang dihasilkan, hal tersebut ditandai dengan tingkat kelarutan bakteri *Pseudomonas sp.* pada media. Kelarutan tersebut disebabkan oleh enzim *membrane-bound oxygenase* yang dikeluarkan oleh bakteri untuk meningkatkan kontak secara langsung antara minyak dengan bakteri, sehingga bakteri dapat memanfaatkan minyak tersebut sebagai sumber karbon sebagai nutrisi dalam menghasilkan biosurfaktan (Georgiou, *et al.*, 2002).

2.5 Uji Aktifitas Biosurfaktan

2.5.1 Uji Drop Collaps

Uji *drop collaps* dilakukan untuk mengetahui aktifitas biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan suatu cairan/limbah. Metode yang digunakan menurut Plaza, *et al.* (2007), yakni larutan dengan permukaan minyak, dituangkan kedalam wadah seperti petri, kemudian diteteskan biosurfaktan sebanyak 10 μ l dari isolat bakteri yang digunakan kedalam larutan dengan permukaan minyak tersebut, ditunggu maksimal dalam waktu 5 menit. Diameter zona bening pada permukaan minyak diukur dan dibandingkan pada kontrol positif dan negatif.

Kecepatan menyebar dari biosurfaktan yang diteteskan mempengaruhi kualitas dari biosurfaktan yang digunakan. Pada media uji, biosurfaktan yang

diteteskan dapat menekan permukaan minyak dikarenakan molekul-molekul biosurfaktan yang ada dipermukaan mengalami resultan gaya ke arah bawah menekan minyak. Adanya kecenderungan menekan ke dalam badan minyak sehingga menghasilkan gaya untuk memecah permukaan minyak, sehingga terbentuk satu luasan baru pada permukaan, yang disebut dengan tegangan permukaan (Hargreaves, 2003).

2.5.2 Uji Emulsifikasi

Emulsi adalah campuran dua cairan, dimana salah satu cairan terdispersi sebagai droplet pada cairan yang lain oleh adanya zat ketiga sebagai penstabil. Proses emulsifikasi pada biosurfaktan yaitu terdispersinya cairan dalam cairan yang sebelumnya kedua cairan tersebut tidak bisa tercampur, dikarenakan dipersatukan oleh dua sifat yang berbeda dari biosurfaktan yaitu hidrofilik dan hidrofobik (Anief, 2000). Menurut Schramm (2002) adanya surfaktan akan menurunkan energi yang dibutuhkan untuk emulsifikasi, dengan menurunkan atau mengurangi tegangan antarmuka.

Uji emulsifikasi adalah metode yang dilakukan untuk menyaring produksi biosurfaktan pada suatu mikroorganisme. Aktivitas emulsifikasi diukur dengan menggunakan metode Johnsons, *et al.* (2002) yang dikutip dari (Fatimah, 2007), 4,5 ml biosurfaktan ditambah dengan 0,5 ml hidrokarbon uji (pelumas, solar atau heksadekan). Setelah divorteks selama 1 menit, campuran tersebut diukur kestabilan emulsinya dengan mengukur nilai OD campuran setelah inkubasi selama 2 jam, pada panjang gelombang 610 nm. Kontrol terdiri dari air mineral

sintetis dan hidrokarbon uji. Aktivitas emulsifikasi dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 5 ulangan.

2.6 Uji Efektifitas Biosurfaktan Terhadap Limbah Cair RPA

2.6.1 Uji TSS

Metode ini digunakan untuk menentukan residu tersuspensi yang terdapat dalam contoh uji air dan air limbah secara gravimetri. Metode ini tidak termasuk penentuan bahan yang mengapung, padatan yang mudah menguap dan dekomposisi garam mineral. Padatan tersuspensi total (TSS), adalah residu dari padatan total yang tertahan oleh saringan dengan ukuran partikel maksimal $2\mu\text{m}$ atau lebih besar dari ukuran partikel koloid (SNI, 2004).

Total Suspended Solids (TSS) merupakan tempat berlangsungnya reaksi-reaksi kimia yang heterogen, dan berfungsi sebagai bahan pembentuk endapan yang paling awal dan dapat menghalangi kemampuan produksi zat organik di suatu perairan (Tarigan & Edward, 2003). Pengukuran kadar TSS yaitu dengan menggunakan gravimetri yang merupakan pemeriksaan jumlah zat dengan cara penimbangan hasil reaksi pengendapan (Lenore, *et al.*, 1998).

Kadar TSS yang tinggi pada limbah cair dapat ditangani dengan pemberian biosurfaktan pada limbah, sehingga meningkatkan kelarutan TSS pada limbah. Pengaruh interaksi biosurfaktan pada limbah dan air menyebabkan pembentukan dispersi molekuler homogen yang berpengaruh terhadap penurunan kadar TSS (Jones, 2008).

2.6.2 Uji Kadar Lemak

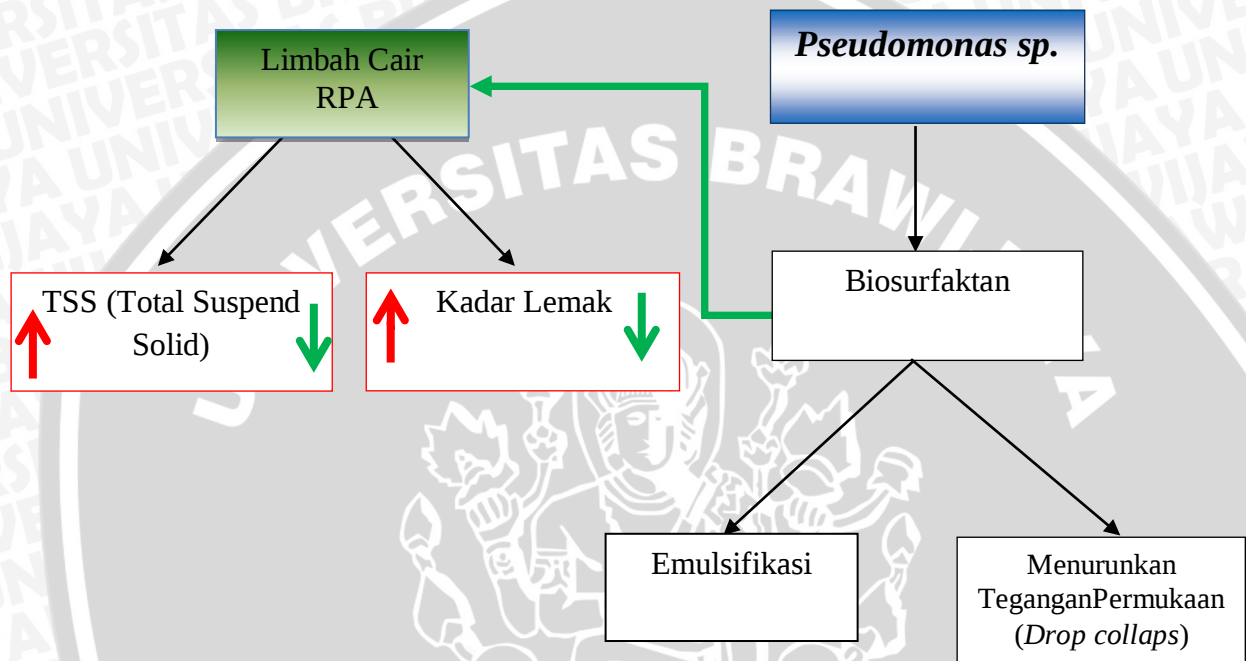
Lemak adalah kelompok ikatan organik yang terdiri atas unsur-unsur Karbon (C), Hidrogen (H), dan Oksigen (O) yang mempunyai sifat dapat larut dalam zat-zat terlarut tertentu seperti *petroleum benzene*, eter, tetapi dalam perbandingan dan susunan kimia yang berlainan. Kadar lemak pada limbah cair yang tinggi menyebabkan limbah tersebut sulit untuk didegradasi dan larut dalam air (Lehninger, 2005).

Limbah cair dalam pengolahannya khususnya lemak, perlu dilakukan penguraian dengan menggunakan biosurfaktan. Penambahan biosurfaktan dalam limbah cair akan menyebabkan turunnya tegangan permukaan larutan, yang berpengaruh terhadap terpecahnya lemak pada limbah cair. Setelah mencapai konsentrasi tertentu, tegangan permukaan akan konstan walaupun konsentrasi biosurfaktan ditingkatkan (Hargreaves, 2003).

Kadar lemak yang terpecah dalam limbah cair menentukan penurunan konsentrasi lemak dalam limbah atau tingkat cemaran limbah cair. Dilakukannya pengujian minyak dan lemak secara *soxhlet* gravimetri untuk menentukan minyak dan lemak pada limbah cair. Kandungan lemak diukur melalui berat yang hilang dari sampel limbah cair atau berat lemak yang dipindahkan (Lehninger, 2005).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

→ : Pengaruh pemberian biosurfaktan

→ : Kadar awal limbah cair RPA

□ : Parameter yang Diamati

Isolat bakteri genus *Pseudomonas sp.* diyakini mampu menghasilkan biosurfaktan dalam jumlah tertentu (Riupassa, 2012). *Pseudomonas sp.* ketika dilakukan penanaman pada minimum media limbah minyak goreng maka dapat menghasilkan biosurfaktan. Biosurfaktan tersebut dihasilkan karena pengaruh senyawa hidrokarbon pada minimum media limbah minyak, yang berpengaruh pada komponen permukaan sel yang hidrofob, sehingga dapat menyebabkan sel tersebut kehilangan integritas struktural selnya dan melepaskan biosurfaktan ke dalam medium (Francy, *et al.*, 2007). Pengujian kualitas biosurfaktan dapat dilakukan dengan uji *drop collaps* dan uji Emulsifikasi untuk diketahui biosurfaktan terbaik dalam menurunkan tegangan permukaan (Fatimah, 2007).

Biosurfaktan ketika direaksikan dengan limbah cair RPA, maka biosurfaktan tersebut akan berikatan dengan molekul hidrokarbon yang tidak larut dalam air. Kemudian biosurfaktan tersebut akan menurunkan tegangan permukaan molekul tersebut dan membentuk *mikroemulsifikasi*. Molekul hidrokarbon yang tadinya tidak terlarut dalam air akan menjadi larut dalam air. Hal ini dapat dinyatakan dengan penurunan kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan kadar lemak dari limbah (Trantip, 2011).

3.2 Hipotesis Penelitian

Biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Pseudomonas sp.* dapat menurunkan kadar *Total Suspended Solid* (TSS) dan Lemak pada limbah cair di Rumah Potong Ayam Tradisional di Kota Malang.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) dan Laboratorium KESMAVET (Kesehatan Masyarakat Veteriner) Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang. Pelaksanaan penelitian di laboratorium berlangsung selama 3 bulan yaitu Mei - Juli 2013.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Pseudomonas sp.* yang didapat dari isolat penelitian Riupassa dkk (2012), yang berasal dari limbah cair di RPA Dinoyo.

4.3 Alat dan Bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah *Pepton HIMEDIA* REF RM 001-500G, *Tryptone Soya Agar (TSA) OXOID* CM0131, *Nutrient Broth (NB) HIMEDIA* REF RM 002-500G, *O/F Basal Medium MERCK* 1.10282, bahan-bahan untuk pewarnaan Gram, laktosa, glukosa, tryptone, substrat kasein, larutan buffer, TCA, tirosin, limbah minyak goreng, limbah cair RPA dan Gliserol.

Sedangkan peralatan yang akan digunakan adalah gelas ukur, gelas beker, cawan petri, pengaduk gelas, erlenmeyer, tabung reaksi, botol kaca bening 200 ml, tabung reaksi, stik ose, objek glass, tabung eppendorf, bunsen, vortex,

spektrofotometer, inkubator, autoklaf, sentrifuse dingin, mikropipet, yellow tip, blue tip, lemari pendingin dan *Laminar Air Flow* (LAF).

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental, dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dipengaruhi 2 faktor, yaitu konsentrasi dan waktu inkubasi, dengan dua tahap pengujian. Tahap pengujian pertama adalah optimasi produksi biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* dengan variabel uji *drop collaps* dan emulsifikasi. Selanjutnya dilakukan penanaman pada lima minimum media limbah minyak goreng dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0%, 10%, 20%, 30% dan 40%, selanjutnya di inkubasi selama 24, 48 dan 72 jam. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan secara *duplo*. Tahap pengujian pertama seperti digambarkan pada tabel 4.1. dengan perhitungan ulangan sebagai berikut :

$$P(n-1) \geq 20$$

ket : P = Jumlah Klompok

$$15(n-1) \geq 20$$

n = Jumlah Ulangan

$$15n-15 \geq 20$$

$$15n \geq 35$$

$$n \geq 2$$

(Steel dan Torii, 1980).

Pengujian tahap kedua yaitu penggunaan supernatan yang dihasilkan dari penanaman *Pseudomonas sp.* pada minimum media limbah minyak goreng dari tahap pertama, selanjutnya diujikan pada limbah RPA dan dihitung penurunan kadar TSS dan lemak. Tahap kedua terdiri dari 8 perlakuan, 3 ulangan dan 2

faktor yaitu waktu dan konsentrasi. Variasi waktu yaitu terdiri dari 24 jam dan 48 jam dengan variasi supernatan dalam limbah cair RPA yaitu 0%, 10%, 20% dan 30%. Tahap pengujian kedua seperti di gambarkan pada Tabel 4.2 dengan perhitungan ulangan sebagai berikut :

$$P(n-1) \geq 20$$

ket : P = Jumlah Klompok

$$8(n-1) \geq 20$$

n = Jumlah Ulangan

$$8n-8 \geq 20$$

$$8n \geq 28$$

$$n \geq 3$$

(Steel dan Torii, 1980).

Tabel 4.1 Rancangan penelitian tahap 1

Lama Inkubasi	Konsentrasi Limbah Minyak Goreng (%)									
	0		10		20		30		40	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
24 jam										
48 jam										
72 jam										

Keterangan : A : Emulsifikasi (nano meter) B : *Drop collaps* (detik)

Tabel 4.2 Rancangan penelitian tahap 2

Lama Inkubasi	Konsentrasi Limbah Rumah Potong Ayam (%)							
	0		10		20		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B
24 jam								
48 jam								

Keterangan : A : Kadar TSS dan B : Kadar lemak

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada tahap 1 :

Variabel bebas : Jumlah koloni bakteri *Pseudomonas sp.*

Variabel tergantung : *Drop collaps* dan emulsifikasi supernatan

Variabel kendali : Waktu inkubasi dan konsentrasi limbah minyak goreng

Variabel yang diamati pada tahap 2 :

Variabel bebas : Konsentrasi biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* dan limbah cair RPA.

Variabel tergantung : Kadar TSS dan Lemak limbah cair RPA.

Variable kendali : Waktu inkubasi dan konsentrasi biosurfaktan.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Isolat Bakteri

4.6.1.1 Isolasi Bakteri

Bakteri didapatkan dari stok bakteri *Pseudomonas sp.* dari peneliti sebelumnya yaitu isolat Riupassa (2012), yang berasal dari limbah cair RPA Dinoyo, dengan kode penyimpanan D42. Selanjutnya bakteri dilakukan penanaman dengan metode *streak* pada media NB (*Nutrient Broth*) dan TSA, untuk di dapatkan *stock culture* dan *fress culture*.

Isolat yang tumbuh di agar miring (*fresh culture*) atau TSA dilakukan uji pewarnaan Gram. Selanjutnya dilakukan konfirmasi

untuk menentukan *Pseudomonas* sp. Menurut Barrow (2003), Identifikasi bakteri yaitu meliputi uji katalase, oksidase, fermentatif, motilitas, spora, laktosa, sukrosa dan glukosa.

4.6.1.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan yaitu untuk mengetahui waktu inkubasi bakteri mencapai fase *stasioner* dan mengetahui jumlah sel bakteri dalam 1ml yang akan ditanamkan pada minimum media. Dilakukan pengamatan pertumbuhan bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC) untuk mengitung koloni bakteri pada kultur dan metode kerapatan optik (*Optical Density*/OD). TPC dilakukan setiap dua jam sekali dan dinyatakan sebagai hasil logaritmik dari jumlah sel/ml kultur, sedangkan pengukuran OD dilakukan setiap dua jam sekali. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri.

4.6.2 Produksi Biosurfaktan

4.6.2.1 Pembuatan minimal media limbah minyak

Minimum media dibuat dalam 5 kategori konsentrasi. Kategori pertama sebagai kontrol negatif berisi aquades 100% (A). Perlakuan 1 konsentrasi 10% (B) berisi aquades 90% dan minyak 10%, perlakuan 2 konsentrasi 20% (C) berisi aquades 80% dan minyak 20%, perlakuan 3 konsentrasi 30% (D) berisi aquades 70% dan minyak 30%, dan perlakuan 4 konsentrasi 40% (E) berisi aquades 60% dan minyak 40%. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan secara

duplo kemudian ditambahkan 1 ml biakan bakteri *Pseudomonas sp.* fase *stasioner* dari NB, selanjutnya di inkubasi menggunakan inkubator goyang dengan kecepatan 120 rpm dan suhu 30⁰ selama 24, 48 dan 72 jam. Sampel diamati dengan variabel waktu 24, 48 dan 72 jam. Selanjutnya dilakukan pembuatan supernatan, menggunakan mesin *sentrifuse* dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4⁰C selama setengah jam (Matz, *et al.*, 2001).

4.6.3 Pengukuran Kualitas Biosurfaktan

1. Uji Aktifitas Emulsi

Aktifitas emulsi dilakukan dengan menambahkan 7,2 ml (90%) supernatan dengan 0,8 ml (10%) hidrokarbon uji (*n*-hexadekan). Setelah itu divortek selama 1 menit. Campuran tersebut diukur kestabilan emulsinya dengan mengukur nilai OD campuran sebelum dan setelah inkubasi suhu 30⁰ selama 2 jam, pada panjang gelombang 610 nm. Kontrol negatif terdiri dari air mineral steril dan minimum media sebagai blanko OD. Aktivitas emulsifikasi dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 5 ulangan (Fatimah, 2007).

2. Uji Drops Collaps

Drop collaps dilakukan dengan meneteskan 1 tetes ($\pm 25\mu\text{l}$) supernatan kultur bakteri pada minimum media minyak di atas permukaan minyak murni pada wadah datar seperti cawan petri. Pengukuran dengan menghitung waktu tetesan supernatan mampu

memecah lemak minyak pada satuan detik. Hasil pengujian dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 5 ulangan (Fatimah, 2007).

4.6.4 Efektivitas Biosurfaktan Pada Limbah Cair RPA

Tahap ini merupakan tahap terakhir dimana biosurfaktan yang diuji diambil dari supernatan terbaik melalui pengukuran kualitas biosurfaktan. Efektivitas diuji dengan menggunakan 5 kategori konsentrasi, yaitu : kontrol negatif dosis 0% yaitu limbah 100% (A), perlakuan 1 konsentrasi 5% (95% limbah ditambahkan 5% supernatan), perlakuan 2 konsentrasi 10% (90% limbah ditambahkan 10% supernatan), perlakuan 3 konsentrasi 15% (85% limbah ditambahkan 15% supernatan), perlakuan 4 konsentrasi 20% (80% limbah ditambahkan 20% supernatan). Masing - masing perlakuan dilakukan secara duplo kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 30⁰ dengan 3 variabel waktu: 24, 48 dan 72 jam.

4.6.5 Uji Efektifitas Biosurfaktan Pada Limbah Cair RPA

1. Uji Kadar TSS

Metode ini digunakan untuk menentukan residu tersuspensi yang terdapat dalam contoh uji air limbah secara gravimetri. Residu dari padatan total yang tertahan oleh saringan dengan ukuran partikel maksimal 2 um atau lebih besar dari ukuran koloid.

Bahan uji yang telah homogen disaring dengan kertas saring yang telah ditimbang. Residu yang tertahan pada saringan dikeringkan sampai mencapai berat konstan pada suhu 103°C. Jika padatan tersuspensi menghambat saringan dan memperlama penyaringan,

diameter pori-pori saringan perlu diperbesar atau mengurangi volume yang diuji. Untuk memperoleh estimasi TSS, dihitung perbedaan antara padatan terlarut total dan padatan total (Lenore, dkk., 2008).

Metode hitung sebagai berikut:

$$\text{Mg TSS per litter} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Volume contoh uji, ml}}$$

Keterangan : A adalah berat kertas saring + residu kering (mg)
B adalah berat kertas saring (mg)

2. Uji Kadar Lemak

Berdasarkan SNI 06-6989.10-2004 uji kadar lemak pada limbah menggunakan metode soxhlet gravimetri. Metode *soxhlet* gravimetri termasuk jenis ekstraksi menggunakan pelarut semi kontinu. Kandungan lemak diukur melalui berat yang hilang dari sampel limbah cair.

Tahap pertama pada pengujian kadar lemak pada limbah cair yaitu, dilakukan penimbang sampel ± 10 gram, bungkus dengan kertas saring, kemudian masukan ke dalam *soxhlet* yang sudah diset dengan pelarut petroleum eter. Dilakukan pemanasan labu *soxhlet* sehingga mencapai 6 siklus, setelah itu dimasukan ke dalam oven dan dipanaskan pada suhu 105°C selama 2 jam. Seterusnya masukan ke dalam eksikator selama 30 menit, timbang dan selanjutnya dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Mg TSS per litter} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Volume contoh uji, ml}}$$

Keterangan : A adalah berat kertas saring + residu kering (mg)
B adalah berat kertas saring (mg)

4.7 Analisis Data

Data dari hasil penelitian ini dianalisis secara statistik kuantitatif, selanjutnya dilakukan analisis data dengan menggunakan uji ANOVA, yaitu untuk mengetahui pengaruh ragam biosurfaktan yang dihasilkan pada minimum media limbah minyak goreng dan ragam pengaruh biosurfaktan terhadap limbah cair RPA dalam menurunkan kadar TSS dan Lemak. Selanjutnya dilakukan pengujian lanjutan dengan BNJ (Beda Nyata Jujur) agar diketahui pengaruh nyata dari masing-masing minimum media dalam menghasilkan biosurfaktan dan pengaruh nyata pemberian biosurfaktan pada limbah RPA di setiap perbedaan konsentrasi biosurfaktan dalam menurunkan kadar TSS dan Lemak. Analisis data diatas dilakukan dengan menggunakan *software* SPSS 16.0.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolat *Pseudomonas sp.*

Isolat bakteri *Pseudomonas sp.* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari hasil penelitian Riupassa (2012), dengan kode D42 yang di isolasi dari limbah cair RPA di Malang, dinyatakan mendekati genus *Pseudomonas sp.*

Isolat bakteri *Pseudomonas sp.* dengan kode D42 selanjutnya dilakukan penanaman pada media TSA didapatkan hasil morfologi koloni berwarna kuning, bentuk koloni bulat tidak beraturan, tepian koloni tidak rata dan beberapa rata (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Hasil Uji verifikasi isolat bakteri kode D42.

Variabel yang diamati	Hasil
Warna	Kuning
Bentuk	Bulat
Tepi	Rata
Bentuk koloni	Coccobasil
Gram	Negatif (-)
Spora	Negatif (-)
Motilitas	Positif (+)
Aerobik	Positif (+)
Katalase	Positif (+)
Oksidase	Positif (+)
O/F	Fermentatif
Indol	Negatif (-)
MR-VP	Positif (+)
TSIA	Positif (+)
BAP	Positif (+)

Berdasarkan *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, *Pseudomonas sp.* memiliki koloni berwarna kuning, tepian koloni rata dan bentuk

koloni bulat (Cowen & Steel, 2004). Menurut penelitian Tantrip & Sirichom (2011), *Pseudomonas sp.* memiliki morfologi bakteri berbentuk batang, Gram negatif, bersifat aerob, katalase positif, oksidasi positif, tidak berspora dan bersifat motil.

Isolat yang telah dilakukan uji verifikasi selanjutnya dilakukan perhitungan kurva pertumbuhan untuk mengetahui lama inkubasi sampai mencapai fase *stasioner* dan untuk mengetahui jumlah bakteri *Pseudomonas sp.* yang ditanam pada minimum media limbah minyak goreng. Perhitungan kurva pertumbuhan dilakukan dengan menghitung nilai absorbansi dan jumlah perhitungan koloni (TPC). Hasil yang didapat dari perhitungan kurva pertumbuhan adalah pada waktu inkubasi ke-52 jam bakteri *Pseudomonas sp.* mencapai fase *stasioner*, sehingga diketahui puncak bakteri itu tumbuh dan memerlukan media baru untuk memulai siklus pertumbuhan baru, dengan nilai absorbansi (OD) sebesar 0,987 dan TPC sebanyak $1,63 \times 10^9$ CFU/ml. Data yang didapat dari perhitungan kurva pertumbuhan digunakan sebagai acuan lama inkubasi *Pseudomonas sp.* sampai fase *stasioner* dan mengetahui jumlah bakteri *Pseudomonas sp.* yang akan ditanam pada minimum media limbah minyak goreng yang digunakan untuk produksi biosurfaktan. Data kurva pertumbuhan ditunjukkan pada Lampiran 2.

5.2 Optimasi Produksi Biosurfaktan Asal *Pseudomonas sp.* pada Media Limbah Minyak Goreng

5.2.1 Uji Aktivitas Emulsifikasi

Pengujian kualitas biosurfaktan dilakukan untuk mengetahui biosurfaktan terbaik pada media limbah minyak goreng, pengujian pertama dilakukan dengan menggunakan uji emulsifikasi. Hasil uji emulsifikasi diketahui terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan setelah dianalisa secara statistik (Tabel 5.2). Hasil uji statistik menggunakan ANOVA dan BNJ dijelaskan pada Lampiran 4.

Tabel 5.2 Rata-rata nilai aktifitas emulsifikasi biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* pada berbagai konsentrasi limbah minyak goreng dan waktu inkubasi yang berbeda

Lama Inkubasi	Emulsifikasi (nano meter)			
	Konsentrasi Limbah Minyak Goreng			
	10%	20%	30%	40%
24 jam	0,03±0,44 ^{cd}	0,05±0,42 ^{cd}	-0,19±0,43 ^{bc}	0,37±0,17 ^{de}
48 jam	-0,384±0,39 ^b	0,349±0,13 ^{de}	0,603±0,44^e	0,34±0,15 ^{de}
72 jam	-0,66±0,28 ^{ab}	-0,9±0,13 ^a	0,32±0,24 ^{de}	0,105±0,30 ^{cde}

*Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada setiap kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa biosurfaktan terbaik dihasilkan *Pseudomonas sp.* yang ditumbuhkan pada media limbah minyak goreng dengan konsentrasi 30% dan lama inkubasi 48 jam dengan nilai 0,603±0,44. Pengaruh konsentrasi limbah minyak goreng yakni pada konsentrasi 10%, 20% dan 40% limbah minyak goreng menghasilkan kualitas biosurfaktan yang menurun, yaitu ditunjukkan dengan nilai emulsifikasi yang lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi 30% dengan inkubasi 48 jam. Sesuai dengan pendapat Desai (2007), perbedaan konsentrasi minimum media berpengaruh terhadap kandungan nutrisi

pada media, yang mendukung metabolisme bakteri dan mempengaruhi kualitas biosurfaktan yang dihasilkan. Kemungkinan penurunan kualitas biosurfaktan dikarenakan tingkat kelarutan jenis medium terhadap bahan pencampurnya, sehingga berpengaruh terhadap kelarutan nutrisi pada medium dan mempengaruhi kualitas biosurfaktan yang dihasilkan. Hal ini berpengaruh terhadap aktivitas penurunan nilai emulsifikasi, serta perbedaan kemampuan dalam menurunkan tegangan permukaan kultur.

Lama inkubasi pada waktu 24 dan 72 jam nilai emulsifikasi lebih rendah dibanding inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 30% limbah minyak goreng. Pada waktu inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 10% dan 20% mengalami peningkatan nilai emulsi, terlihat pada Tabel 5.2. Menurut Francy, *et al.* (2007), lama inkubasi mempengaruhi kandungan nutrisi pada substrat minimum media yang dimetabolisme *Pseudomonas sp.* untuk menghasilkan biosurfaktan dengan kualitas yang berbeda. Perbedaan kualitas biosurfaktan berpengaruh terhadap penurunan nilai emulsifikasi.

Media pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp.* pada limbah minyak goreng dapat menghasilkan biosurfaktan dengan kualitas baik yaitu dibuktikan dengan biosurfaktan mampu mengemulsi heksadekan. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Miguez & Ingram (2006), menyatakan bahwa pada substrat heksadekan menyebabkan sel bakteri *Pseudomonas sp.* bersifat lebih hidrofob. Hidrofobitas sel ini menyebabkan sel tersebut menunjukkan aktifitas emulsifikasi lebih baik dan mampu menurunkan tegangan permukaan. Aktifitas emulsifikasi ditunjukan dengan tercampurnya heksadekan dengan biosurfaktan yang dihasilkan sel bakteri

Pseudomonas sp. tanpa terjadi pengendapan yang membedakan kedua zat cair tersebut.

Limbah minyak sebagai media pertumbuhan *Pseudomonas sp.* mempunyai tingkat kelarutan yang rendah yang mempengaruhi limbah minyak mencapai sel bakteri dikarenakan senyawa hidrokarbon lebih besar dari bakteri. Senyawa hidrokarbon pada minyak mempengaruhi permukaan sel bakteri yang bersifat hidrofobik yang menyebabkan sel tersebut kehilangan integritas struktural selnya dan melepaskan biosurfaktan ke dalam medium, sehingga biosurfaktan mampu mendegradasi hidrokarbon menjadi lebih kecil dan dapat masuk dalam sel yang dapat mengemulsi dengan baik (Fatimah, 2007).

Shaw (2008), dalam penelitiannya menyatakan bahwa sifat biosurfaktan yang paling baik didapatkan pada kondisi nilai emulsi besar yang berarti mempunyai kestabilan emulsi yang paling besar. Kestabilan emulsi tersebut ditunjukkan dengan cairan yang pada awalnya tidak bercampur menjadi tercampur (tercampur sempurna). Menurut Anief (2000), cairan yang teremulsi yaitu seperti tercampurnya minyak dengan air karena pengaruh emulgator sehingga antara minyak dengan air dapat tercampur tanpa menunjukkan pengendapan. Menurut Schramm (2002), terjadinya emulsifikasi disini yaitu terdispersinya cairan dalam cairan yang dipicu oleh adanya tegangan permukaan. Adanya surfaktan akan menurunkan energi yang dibutuhkan untuk emulsifikasi, dengan menurunkan atau mengurangi tegangan antar muka.

5.2.2 Uji Kualitas Biosurfaktan Dengan Metode *Drop Collaps*

Pengujian biosurfaktan dengan menggunakan uji *drop collaps* digunakan untuk mengetahui kualitas biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan dihitung berdasarkan kecepatan waktu yang dibutuhkan biosurfaktan dalam memecah minyak, semakin cepat waktu yang dibutuhkan biosurfaktan dalam memecah minyak kualitas biosurfaktan tersebut semakin baik. Hasil uji *drop collaps* setelah dianalisa secara statistik ($p < 0,05$) didapatkan nilai hasil perbedaan yang signifikan pada beberapa perlakuan (Tabel 5.3). Hasil uji statistik menggunakan ANOVA dijelaskan pada Lampiran 4.

Tabel 5.3 Rata-rata nilai uji *drop collaps* biosurfaktan asal *Pseudomonas sp* pada berbagai konsentrasi limbah minyak goreng dan lama inkubasi

Lama Inkubasi	<i>Drop collaps</i> (detik)			
	Konsentrasi Limbah Minyak Goreng			
	10%	20%	30%	40%
24 jam	65±7,07 ^h	49±4,24 ^g	40±7,07 ^{ef}	26,5±2,12 ^{de}
48 jam	19,5±3,53 ^{cd}	7±1,41 ^{abc}	1±0 ^a	1,5±0,70 ^a
72 jam	18±1,41 ^{bcd}	6±0 ^{abc}	4,5±4,95 ^{ab}	2±1,41 ^a

*Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada setiap kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Terlihat di Tabel 5.3 bahwa perbedaan konsentrasi dan lama waktu inkubasi mempengaruhi secara signifikan terhadap hasil, yaitu ditunjukkan dengan perbedaan waktu yang dibutuhkan dalam memecah minyak. Biosurfaktan terbaik dihasilkan dari bakteri *Pseudomonas sp.* yang ditanam pada minimum media limbah minyak goreng dengan konsentrasi 30% limbah minyak goreng di inkubasi selama 48 jam. Biosurfaktan yang dihasilkan dapat memecah minyak dengan waktu 1 detik.

Berdasarkan tabel 5.3, pada konsentrasi limbah minyak goreng 10%, 20%, 40% yang diinkubasi selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam menunjukkan kemampuan biosurfaktan dalam memecah minyak membutuhkan waktu yang lebih lama bila dibandingkan dengan inkubasi 48 jam pada konsentrasi 30%, sama halnya pada inkubasi 24 jam dan 72 jam dengan konsentrasi 30% waktu yang dibutuhkan dalam memecah minyak lebih lama dibandingkan dengan inkubasi 48 jam pada konsentrasi 30%. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa lama inkubasi 48 jam merupakan waktu optimal bakteri *Pseudomonas sp.* pada minimum media limbah minyak goreng untuk menghasilkan biosurfaktan terbaik, sedangkan konsentrasi optimal dalam menghasilkan biosurfaktan terbaik yaitu pada konsentrasi 30% limbah minyak goreng. Keadaan ini tampaknya sesuai dengan pendapat Desai (2007), biosurfaktan yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri bisa saja berbeda kualitas maupun kuantitasnya ketika ditumbuhkan pada substrat dengan konsentrasi dan inkubasi yang berbeda, sehingga memberikan perbedaan kemampuan dalam menurunkan tegangan permukaan.

Youssef, *et al.* (2004), menyatakan bahwa hasil uji kualitas biosurfaktan dengan metode *drop collaps* dilihat dari kemampuan senyawa biosurfaktan dalam memecah atau menurunkan tegangan permukaan, selama kurang dari 1 menit. Apabila hasil uji *drop collaps* dengan waktu diatas 1 menit, menunjukkan kualitas yang buruk dan belum bisa digunakan dalam proses bioremediasi.

Kecepatan menyebar atau memecahnya minyak tersebut dipengaruhi oleh biosurfaktan yang ditetaskan dapat menekan permukaan minyak dikarenakan molekul-molekul biosurfaktan yang ada dipermukaan mengalami resultan gaya ke

arah dalam badan minyak. Hal ini mengakibatkan molekul biosurfaktan cenderung menekan atau berdesakan ke dalam menghindari permukaan, adanya kecenderungan menekan ke dalam badan cairan, sehingga menghasilkan gaya yang menyebabkan terbentuk satu luasan baru pada permukaan disebut dengan tegangan permukaan (Hargreaves, 2003).

5.3 Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Asal *Pseudomonas sp.* Terhadap Kadar TSS pada Limbah Cair RPA Tradisional Malang

Hasil uji kualitas biosurfaktan terbaik dari uji emulsifikasi dan *drop collaps* di dapatkan biosurfaktan terbaik dihasilkan dari *Pseudomonas sp.* yang ditanam pada minimum media limbah minyak goreng dengan konsentrasi 30% dan diinkubasi 48 jam. Selanjutnya dari biosurfaktan terbaik diujikan pada limbah cair RPA dan diukur kadar TSS dan lemak. Kadar *Total Suspended Solid* (TSS) adalah residu dari padatan total yang tertahan oleh saringan dengan ukuran partikel maksimal 2 um atau lebih besar dari partikel koloid (SNI, 2004). Hasil uji potensi bakteri *Pseudomonas sp.* terhadap kemampuan menurunkan kadar TSS setelah dianalisa secara statistik ($p < 0.05$) menunjukkan perbedaan yang signifikan pada masing-masing perlakuan (Tabel 5.4). Hasil uji ANOVA dijelaskan pada Lampiran 4.

Tabel 5.4 Rata-rata kadar TSS limbah cair RPA terhadap pengaruh pemberian biosurfaktan pada berbagai konsentrasi dan lama inkubasi

Lama Inkubasi	<i>Total Suspended Solid (%)</i>			
	Konsentrasi Biosurfaktan			
	0%	10%	20%	30%
24 jam	0,032±0,0003 ^h	0,028±0,0004 ^f	0,026±0,0003 ^e	0,020±0,0002 ^c
48 jam	0,029±0,0003 ^g	0,024±0,0003 ^d	0,019±0,0003 ^b	0,013±0,0002^a

*Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada setiap kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Perbedaan konsentrasi biosurfaktan serta lama waktu inkubasi pada proses bioremediasi, memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan kadar TSS limbah cair RPA (Tabel 5.4). Berdasarkan hasil uji TSS seperti yang terlihat pada Tabel 5.4 menunjukkan bahwa, biosurfaktan dengan konsentrasi 30% yang di campurkan dengan 70% limbah cair RPA dan diinkubasi selama 48 jam memiliki kemampuan menurunkan kadar TSS pada limbah cair paling baik, dibandingkan dengan kelompok kontrol 48 jam dengan nilai kadar TSS $0,29 \pm 0,0003\%$ dan mengalami penurunan menjadi $0,013 \pm 0,0002\%$ pada konsentrasi 30% biosurfaktan dan inkubasi 48 jam. Terlihat pada Tabel 5.4, konsentrasi biosurfaktan 30% dengan lama waktu inkubasi 48 jam memiliki kemampuan menurunkan kadar TSS jika dibandingkan dengan yang diinkubasi selama 24 jam saja, yang mana terlihat pada Tabel 5.4 lama inkubasi 24 jam memiliki kadar TSS lebih tinggi dari pada 48 jam, sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin lama inkubasi memberikan pengaruh menurunkan kadar TSS. Berdasarkan penelitian Effendi (2003) pengaruh lama inkubasi mempengaruhi lama waktu biosurfaktan berikatan dengan banyaknya partikel-partikel yang tidak

terlarut, sehingga menyebabkan limbah cair larut dan mengurangi endapan pada bahan yang dicuci, atau disebut penurunan kadar TSS.

Pengaruh konsentrasi biosurfaktan yang di berikan pada limbah cair RPA dengan konsentrasi 10%, 20% dan 30% menyebabkan penurunan kadar TSS. Terlihat pada Tabel 5.4. Menurut Effendi (2003) biosurfaktan merupakan bahan organik yang berperan sebagai bahan aktif untuk pembersih. Semakin tinggi konsentrasi biosurfaktan yang digunakan dapat menurunkan padatan tidak terlarut dalam konsentrasi lebih tinggi, sehingga memungkinkan partikel-partikel yang menempel pada bahan-bahan yang dicuci terlepas dan mengapung atau terlarut dalam air dan menyebabkan penurunan kadar TSS. Partikel yang terlepas dan mengapung terlarut dengan air menunjukkan berkurangnya padatan yang tidak larut dalam air atau disebut penurunan kadar TSS.

Kadar TSS pada limbah cair rumah potong ayam masih beresiko mengakibatkan pencemaran, yaitu terlihat pada penurunan kadar TSS terbaik dengan nilai 0.013% yang sama dengan 129,3 ppm. Berdasarkan Kep.51/MENLH/10 (1995) minimum kadar TSS pada suatu limbah cair sebesar 100 ppm.

5.4 Pengaruh Pemberian Biosurfaktan Asal *Pseudomonas* sp. Terhadap Kadar Lemak pada Limbah Cair RPA Tradisional Malang

Kadar lemak yang terpecah dalam limbah cair menentukan konsentrasi lemak dalam limbah atau tingkat cemaran limbah, sehingga perlu dilakukan pengujian kadar minyak dan lemak pada limbah (Lehninger, 2005).

Hasil dari pengukuran kadar lemak pada limbah cair RPA yang dipengaruhi pemberian biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* dengan berbagai konsentrasi dan lama inkubasi terdapat pada Tabel 5.5. Hasil uji statistik menggunakan ANOVA dijelaskan pada Lampiran 4.

Tabel 5.5 Rata-rata kadar lemak limbah cair RPA terhadap pengaruh pemberian biosurfaktan dalam berbagai konsentrasi dan lama inkubasi

Lama Inkubasi	Kadar Lemak (%)			
	Konsentrasi Biosurfaktan			
	0%	10%	20%	30%
24 jam	0,036±0,001 ^{cd}	0,032±0,003 ^{abc}	0,031±0,002 ^{abc}	0,028±0,003 ^{ab}
48 jam	0,060±0,004 ^e	0,040±0,003 ^d	0,034±0,010 ^{bcd}	0,025±0,001^a

*Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada setiap kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Hasil uji biosurfaktan asal bakteri *Pseudomonas sp.* dari minimum media limbah minyak goreng terhadap kadar lemak pada limbah cair, setelah dianalisa secara statistika ($p < 0,05$) menunjukkan perbedaan yang signifikan pada masing-masing perlakuan (Tabel 5.5). Pengaruh perbedaan konsentrasi serta lama waktu inkubasi biosurfaktan pada limbah cair RPA dapat menyebabkan penurunan kadar lemak pada limbah cair RPA (Tabel 5.5). Hasil pengujian biosurfaktan pada limbah cair terhadap kadar lemak, menunjukkan bahwa biosurfaktan dengan konsentrasi 30% yang diinkubasi selama 48 jam memiliki kemampuan menurunkan kadar lemak paling tinggi pada limbah cair. Berdasarkan Tabel 5.5 limbah cair pada konsentrasi 100% yang di inkubasi selam 48 jam (kontrol 48) dengan kadar lemak 0,060±0,004% merupakan kadar lemak paling tinggi, sedangkan kadar lemak paling rendah terlihat pada pengaruh pemberian

biosurfaktan pada konsentrasi 30% dan inkubasi 48 jam dengan nilai $0,025 \pm 0,001\%$. Terlihat pada Tabel 5.4 bahwa konsentrasi biosurfaktan 30% dengan lama waktu inkubasi 48 jam memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menurunkan kadar lemak jika dibandingkan dengan yang diinkubasi selama 24 jam yaitu kadar lemak sebesar $0,028 \pm 0,003\%$. Seperti pada pengujian kadar TSS, dapat disimpulkan bahwa semakin lama inkubasi dan tingginya konsentrasi biosurfaktan berpotensi menurunkan kadar lemak pada limbah cair. Ansel (2008) menyebutkan pengaruh tingginya konsentrasi biosurfaktan dan lama waktu inkubasi menyebabkan lebih banyak partikel hidrofilik dan hidrofobik berikatan dengan lemak, yang menyebabkan lemak larut pada air. Kelarutan lemak dengan air dikarenakan proses emulsifikasi lemak pada limbah cair, sehingga menyebabkan penurunan kadar lemak.

Kadar lemak pada limbah cair rumah potong ayam dalam penelitian ini memiliki kadar lemak, dengan nilai terendah sebesar 0,025% atau sebanding dengan 250 ppm, sedangkan yang sudah ditetapkan oleh Kep.51/MENLH/10 (1995) yakni, kadar lemak limbah cair sebesar 15 ppm, sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar lemak limbah cair rumah potong ayam masih menyebabkan pencemaran lingkungan.

Menurut Lehninger (2005) penurunan kadar lemak pada limbah cair disebabkan lemak terpecah dalam limbah cair sehingga menentukan konsentrasi lemak dalam limbah atau tingkat cemaran limbah cair. Tingginya konsentrasi lemak pada limbah cair memerlukan bahan pengurai (surfaktan) dengan

konsentrasi lebih tinggi dan dibutuhkan waktu lebih lama dalam menguraikan padatan lemak.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Limbah minyak goreng sebagai media pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp.* dapat menghasilkan biosurfaktan terbaik dengan konsentrasi 30% limbah minyak goreng dengan lama inkubasi 48 jam didapatkan nilai emulsifikasi $0,603 \pm 0,44$ nm dan nilai *drop collaps* 1 ± 0 detik.
2. Biosurfaktan asal bakteri *Pseudomonas sp.* mampu menurunkan kadar TSS dan lemak pada limbah cair RPA tradisional, pada konsentrasi 30% biosurfaktan dengan waktu inkubasi 48 jam didapatkan penurunan kadar TSS $0,01293 \pm 0,00015\%$ dan kadar lemak $0,025 \pm 0,0010\%$.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut agar diketahui secara spesifik spesies bakteri *Pseudomonas sp.* yang digunakan dalam penelitian ini.
2. Perlu dilakukan pengujian batas waktu biosurfaktan asal *Pseudomonas sp.* mengalami kerusakan.

DAFTAR PUSTAKA

Adamson, A.W. 2000. *Physical chemistry of surface*. A wiley-Interscience Publication, USA.

Anandaraj, B and Thivakaran P. 2010. Isolation and Production of Biosurfactant producing Organism From Oil Spilled Soil. *Journal Bioscient Technology*, vol 1 (3), 2010 :120-126.

Anonim, 2012. SNI 06-6989.2.2004: *Cara Uji Kadar Lemak pada Limbah Dengan Soxhlet Gravimetri*. Badan Standarisasi Nasional Indonesia.

Anonim, 2012. SNI 6989.72:2009: *Cara Uji Padatan Tidak Terlarut (TSS)*. Badan Standarisasi Nasional Indonesia.

Ansel, H.C. 2008. *Surfaktan: Physical of surface*. University Sains Malaysia. Malaysia. 1-7, 28-30.

Anief, 2000. Kimia Lingkungan: *Uji Tegangan Permukaan*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 27-30, 41-42.

Barrow and Feltham. 2003. *Manual for Identification of medical bacteria*. 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge. London.

Banat, I.M. 2000. *Manual for the Identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. Cambridge. London.

Camazano, M.S., R.M.S.Cruz and S.M. Martin. 2003. Evaluation of component characteristics of soil-surfactant-herbicide system that affect enhanced desorption of linuron and atrazine preadsorbed by soil. *Environ. Sci.Technol.*, 37, 2759-2766.

Desai, J.D. 2007. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial potential. *Microbiol. Mol.Biol. Rev.* 61(1):47-64.

Fatimah, 2007. Uji Produksi Biosurfaktan Oleh *Pseudomonas sp.* Pada Substrat Yang Berbeda. *Jurnal Kimia*. FMIPA Universitas Airlangga. Surabaya. (3) : 145-147.

Francy, D.S, Thomas J.M, Raymond R.L and Ward C.H, 2007. Emulsification of Hydrocarbons by Surface Bacteria. *J ind Microbiol* 8: 234–246.

Georgiou, L.H.,O. Kappeli and A.Fiechter. 2003. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl . Microbiol. Biotechnol.* 24:443-448.

Hargreaves, 2003. Screening and Optimization of Biosurfactant Production by the Hydrocarbon-degrading Bacteria. *Journal of Chemical* : 615-623.

Horowitz, A., D. Gutnick and E. Rosenberg. 2005. Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil: *Appllied Microbiology.* 30(1) p. 10-19.

Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup No. 51 Tahun 1995, *Tentang Baku Mutu Air Limbah.*

Kosaric, N. 2001. Biosurfactant and Their Applications for Soil Bioremediation. *Journal of Food Technol, Biotechnol.* 39(4) : 295-304.

Lehninger, A. L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia* Jiid 1. Erlanggga: Jakarta.

Lenore, S, 2008. Standard Methods for the Examination of Water and Waste. *Word J Microbiol and Biotechnol.* 12: 82–84.

Lin, C.H. 2006. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:914-921.

Matz, Werben and Reunald. 2001. Phenotypic variation in *Pseudomonas* sp. CM10 determines microcolony formation and survival under protozoan grazing. *Journal. Department of Physiological Ecology* : 175-178.

Miguez, C.B and Ingram J.M, 2006. Bioemulsifer Production Using Non Aseptic Fermentation of Mixed Cultures. *Can J Microbiol* 32:248–252.

Nielsen, J. L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercade, F. Comelles and M. P. Bosch. 2000. Chemical Characterization and Physicochemical Behavior of Biosurfactant. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: 141-145.

Plaza, G.A., Zjawiony, I and Banat, I.M., 2007. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journals of Petroleum Science and Engineering* 50: 71-77.

Riupassa, R.M. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan asal Limbah Rumah Potong Ayam Tradisional di Kota Malang. *Jurnal. Program Kedokteran Hewan*. Universitas Brawijaya: Malang.

Schramm, 2002. Screening and Optimization of Biosurfactant Production by the Hydrocarbon-degrading Bacteria. *Jurnal*. University Sains Malaysia. Malaysia. 615-623.

Siwiendrayanti, Arum dkk. 2007. Penurunan Kadar BOD Air Limbah Rumah Potong Ayam (RPA) pada Pengoprasian Trickling Filter dengan Berbagai Variasi Frekuensi Sirkulasi (Studi Pengolahan Air Limbah dengan Teknologi Tepat Guna di RPA Pasar Rejomulyo Semarang). *Penelitian Dosen Muda*. Dirjen DIKTI.

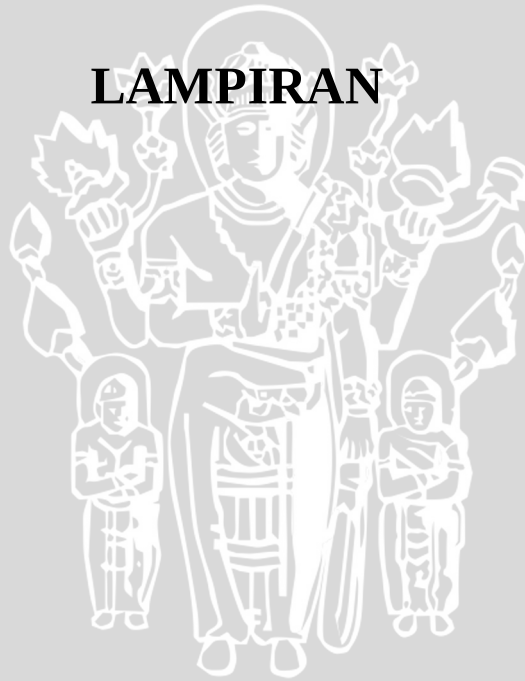
Singgih, M.L. dan Kariana M., 2008. Peningkatan Produktifitas & Kinerja Lingkungan Dengan Pendekatan Green Productivity Pada Rumah Pemotongan Ayam. XX, *Purifikasi "J. Tekling* 9 (2) : 21

Tarntrip, R and Sirichom T., 2011. Isolation Of Proteolytic, Lipolytic, And Bioemulsifying Bacteria For Improvement Of The Aerobic Treatment Of Poultry Processing Wastewater. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5 (30)

Tahzibi, A., Kamal, F dan Assadi M.M., 2004. Improved Production of Rhamno lipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. *Iranian Biomedical Journal. Dept. Of Pharmaceutics. Faculty of Pharmacy*. Tehran University: Tehran.

Wardhana, W.A. 2005. *Dampak Pencemaran Lingkungan*. Penerbit Andi Yogyakarta: D I Yogyakarta.

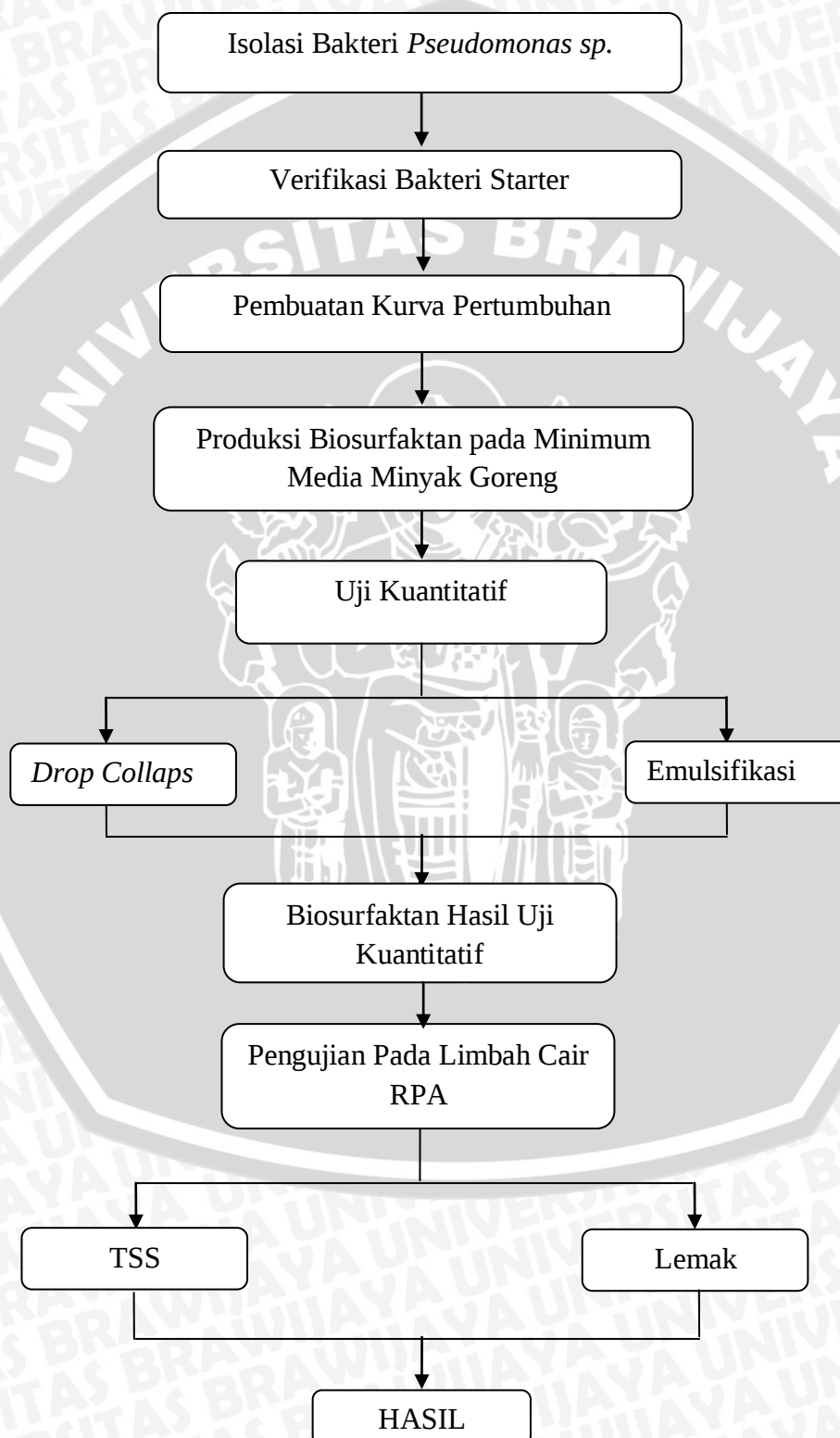
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

Lampiran 1

SKEMA KERJA PENELITIAN



Lampiran 2

Langkah kerja pengujian karakterisasi isolat bakteri *Pseudomonas sp.*

1. Pengujian pewarnaan Gram

- Persiapan sampel.
- Bersihkan *object glass* dengan tisu beralkohol.
- Ambil sedikit *aquades* dan letakkan diatas *object glass* kemudian difiksasi.
- Ambil satu ose koloni bakteri dari biakan padat dengan menggunakan kawat ose dan campur dengan *aquades* yang ada di *object glass*, kemudian ratakan hingga menghasilkan ulasan yang sangat tipis.
- Fiksasi diatas api untuk membunuh dan melekatkan bakteri pada *object glass*.
- Dilakukan pengujian gram.
- Preparat ulas yang sudah dibuat diberi *methilen blue* dan biarkan selama 1 menit. Cuci dengan *aquades* kemudian difiksasi.
- Beri larutan pemucat (alkohol 95%) dan biarkan selama 30 detik. Cuci dengan *aquades* dan fiksasi.
- Beri larutan *safranin* dan biarkan selama 1 menit. Cuci dengan *aquades* dan fiksasi.
- Dilakukan pengamatan.
- Amati dibawah mikroskop: jenis gram dan bentuknya. Penggunaan mikroskop dengan pembesaran 1000× dengan menambahkan minyak emersi diatas preparat yang telah dibuat.
- Ambil gambar dari tiap sampel yang diamati.

2. Pewarnaan spora

a. Persiapan sampel/pembuatan pereparat

- a) *Object glass* dibersihkan dengan tisu beralkohol.
- b) Diambil sedikit *aquades* dan letakkan diatas *object glass* kemudian difiksasi sebentar.

- c) Diambil satu ose koloni bakteri dari bakteri padat dengan menggunakan kawat ose dan dicampurkan dengan aquades yang ada di *object glass* kemudian diratakan hingga menghasilkan ulasan yang sangat tipis.
- d) Difiksasi diatas api untuk membunuh dan melekatkan bakteri pada *object glass*.

1.1 Pengujian spora

- a) Dipreparasi ulas yang sudah dibuat ditetesi larutan pewarna *malachite green* selama kurang lebih 10 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 detik.
- b) Diberikan larutan selama 1menit lalu dibilas dengan air dan dikeringkan.

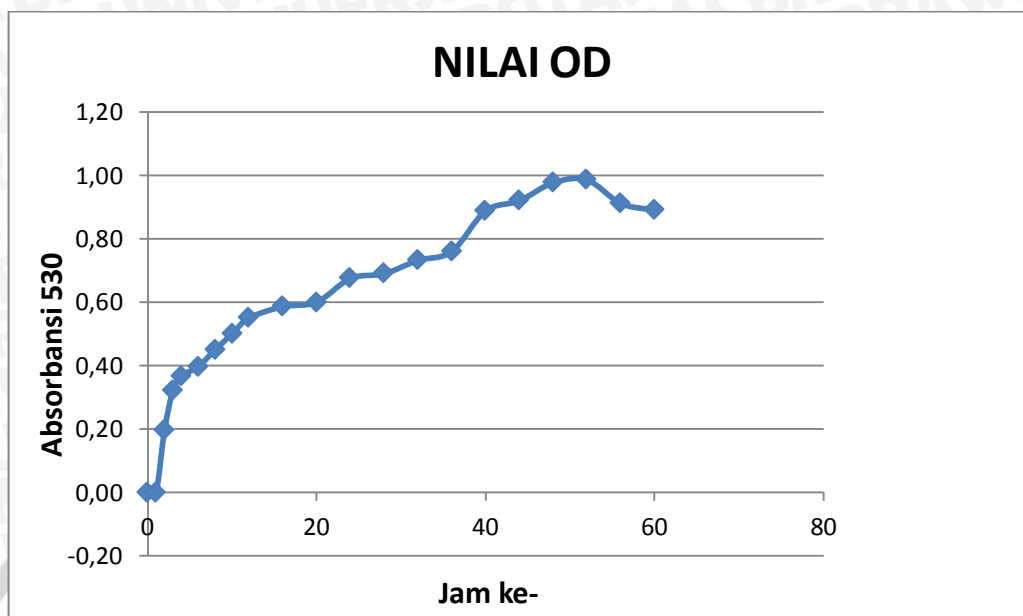
1.2 Pengamatan

- a) Diamati dibawah mikroskop, untuk dilihat ada atau tidaknya spora. Indikasi terdapatnya endospora akan berwarna hijau dan bagian sela yang tidak mengandung endospora akan berwarna merah terang. Penggunaan mikroskop dengan pembesaran 1000x ditetesi dengan minyak emersi diatas preparat yang telah dibuat.
- b) Diambil gambar dari tiap sampel yang diamati.

Lampiran 3. Perhitungan Kurva Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* sp.

Tabel 3.1 Hasil Perhitungan *Total Plate Count* (TPC) dan *Optical Density* (OD)

TIME	Nilai OD	Σ TPC (CFU/ml)
T0	0,000	<25
T1	0.001	<25
T2	0.092	$3,22 \times 10^6$
T3	0.097	$8,24 \times 10^6$
T4	0.099	$1,22 \times 10^7$
T6	0.107	$3,54 \times 10^7$
T8	0.129	$7,07 \times 10^7$
T10	0.501	$9,02 \times 10^7$
T12	0.551	$1,01 \times 10^8$
T16	0.587	$1,42 \times 10^8$
T20	0.601	$1,81 \times 10^8$
T24	0.676	$3,33 \times 10^8$
T28	0.691	$5,67 \times 10^8$
T32	0.702	$7,54 \times 10^9$
T36	0.761	$9,05 \times 10^9$
T40	0,889	$1,00 \times 10^9$
T44	0,921	$1,25 \times 10^9$
T48	0,978	$1,42 \times 10^9$
T52	0,987	$1,63 \times 10^9$
T56	0,913	$1,50 \times 10^9$
T60	0,891	$1,38 \times 10^9$



Gambar 1. Diagram Hubungan Waktu dan Nilai Absorbansi

Lampiran 4.

Uji kualitas biosurfaktan

1. Uji emulsifikasi

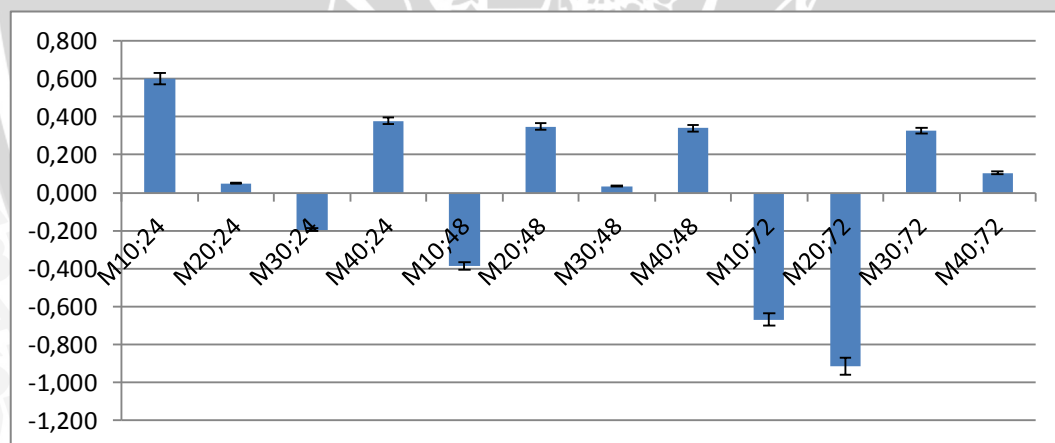
- Aktivitas emulsifikasi diukur dengan menggunakan metode Johnsons, *et al.* (2002), 4,5 ml supernatan ditambah dengan 0,5 ml hidrokarbon uji
- Divorteks selama 1 menit, campuran tersebut diukur kestabilan emulsinya dengan mengukur nilai OD campuran setelah inkubasi selama 2 jam, pada panjang gelombang 610 nm.
- Kontrol terdiri dari air mineral sintetis hidrokarbon uji.
- Aktivitas emulsifikasi dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 3 ulangan.

2. Hasil uji emulsifikasi

Tabel 1. Hasil uji emulsifikasi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	Stdev
	1	2	3			
M10;24	0.505	0.57	0.734	1.809	0.603	0.1180
M20;24	-0.407	0.433	0.125	0.151	0.050	0.4249
M30;24	-0.54	-0.335	0.293	-0.582	-0.194	0.4340
M40;24	0.361	0.221	0.554	1.136	0.379	0.1672
M10;48	0.067	-0.568	-0.652	-1.153	-0.384	0.3931
M20;48	0.246	0.297	0.504	1.047	0.349	0.1366
M30;48	0.299	-0.481	0.284	0.102	0.034	0.4461
M40;48	0.23	0.277	0.518	1.025	0.342	0.1545
M10;72	-0.346	-0.792	-0.867	-2.005	-0.668	0.2817
M20;72	-0.996	-0.984	-0.764	-2.744	-0.915	0.1306
M30;72	0.31	0.096	0.578	0.984	0.328	0.2415
M40;72	0.361	0.191	-0.237	0.315	0.105	0.3081

Gambar 2. Diagram rata-rata hasil uji emulsifikasi



Tabel 2. Uji homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances

Dependent Variable: Emulsi

F	df 1	df 2	Sig.
1.979	11	24	.079

Tabel 3. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Emulsi
N		36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.00236
	Std. Deviation	.510527
Most Extreme Differences	Absolute	.200
	Positive	.102
	Negative	-.200
Kolmogorov-Smirnov Z		1.198
Asymp. Sig. (2-tailed)		.113

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tabel 4. Analisis Ragam

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Emulsi					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Media	1.177	3	.392	4.456	.013
Waktu	1.605	2	.803	9.116	.001
Media * Waktu	4.227	6	.705	8.001	.000
Error	2.113	24	.088		
Total	9.122	35			

Tabel 5. Uji Tukey Emulsifikasi

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M20;72	-0.915	a
M10;72	-0.668	ab
M10;48	-0.384	b
M30;24	-0.194	bc
M30;48	0.034	c
M20;24	0.050	cd
M40;72	0.105	cde
M30;72	0.328	de
M40;48	0.342	de
M20;48	0.349	de
M40;24	0.379	de
M10;24	0.603	e

3. Uji *drop collaps*

- Pengujian dilakukan dengan menggunakan cawan petri yang diolesi minyak goreng pada permukaannya.
- Biosurfaktan diteteskan pada cawan petri yang diolesi minyak goreng dengan menggunakan mikropipet.
- Diamati kecepatan biosurfaktan menyebar pada permukaan minyak goreng dalam satuan detik.

4. Hasil Uji *drop collapse*

Tabel 6. Hasil uji *drop collaps*

Perlakuan	Ulangan		Rata-rata	stdev
	1	2		
M 10 24	60	70	65	7,071068
M 20 24	52	46	49	4,242641
M 30 24	35	45	40	7,071068
M 40 24	25	28	26,5	2,12132
M 10 48	22	17	19,5	3,535534
M 20 48	8	6	7	1,414214
M 30 48	1	1	1	0
M 40 48	2	1	1,5	0,707107
M 10 72	17	19	18	1,414214
M 20 72	6	6	6	0
M 30 72	8	1	4,5	4,949747
M 40 72	1	3	2	1,414214

Tabel 7. Uji Tukey *Drop collaps*

perlakuan	Rata2	Subset for alpha = 0.05							Notasi
		1	2	3	4	5	6	7	
M3048	1	1.0000							a
M4048	1.5	1.5000							a
M4072	2	2.0000							a
M3072	4.5	4.5000	4.5000						ab
M2072	6	6.0000	6.0000	6.0000					abc
M2048	7	7.0000	7.0000	7.0000					abc
M1072	18		18.0000	18.0000	18.0000				bcd
M1048	19.5			19.5000	19.5000				cd
M4024	26.5				26.5000	26.5000			de
M3024	39.5					40.0000	40.0000		ef
M2024	49						49.0000		g
M1024	65							65.0000	h
Sig.		.875	.085	.085	.529	.085	.457	1.000	

5. Uji kadar TSS

- Sampel limbah sebanyak 100ml disaring dengan menggunakan kertas saring *whatman* 42 yang sudah konstan ke erlemeyer 250cc.
- Oven kertas saring bersama residu pada suhu 105°C selama 2 jam, kemudian didinginkan dengan menggunakan desikator selama 30 menit.
- Dilakukan penimbangan dan pengulangan penimbangan dengan selang 30 menit sampai didapatkan berat konstan. Dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Mg TSS per litter} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Volume contoh uji, ml}}$$

Keterangan : A adalah berat kertas saring + residu kering (mg)

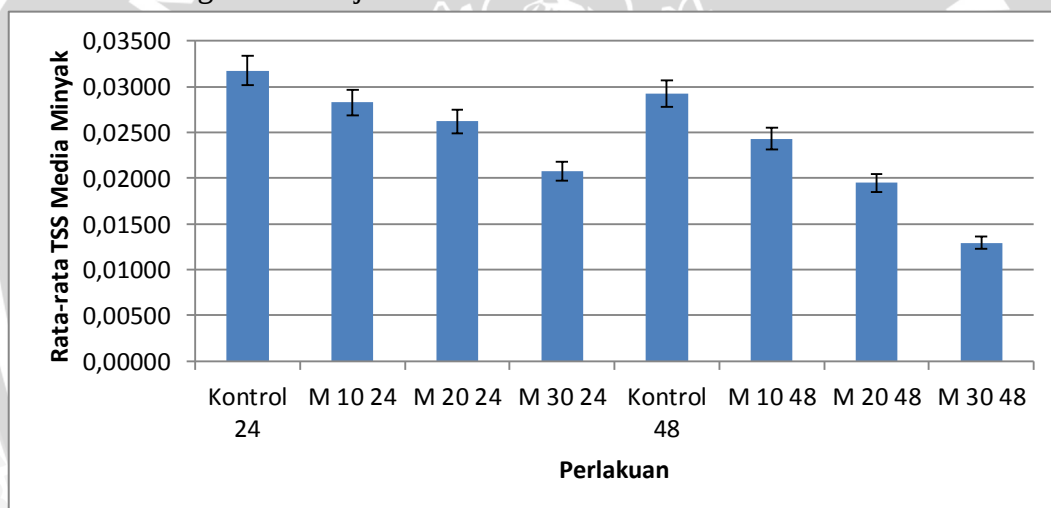
B adalah berat kertas saring (mg)

6. Hasil uji kadar TSS

Tabel. 8 Hasil uji kadar TSS

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	Stdev
	1	2	3			
Kontrol 24	0.0317	0.0316	0.0319	0.10	0.03173	0.00015
M 10 24	0.0284	0.0285	0.0279	0.08	0.02827	0.00032
M 20 24	0.0262	0.0264	0.026	0.08	0.02620	0.00020
M 30 24	0.0208	0.0211	0.0205	0.06	0.02080	0.00030
Kontrol 48	0.0293	0.0295	0.0289	0.09	0.02923	0.00031
M 10 48	0.0244	0.0239	0.0246	0.07	0.02430	0.00036
M 20 48	0.0193	0.0194	0.0198	0.06	0.01950	0.00026
M 30 48	0.0129	0.0127	0.0132	0.04	0.01293	0.00025

Gambar 4. Diagram hasil uji TSS



Tabel. 9 Uji Homogenitas

Dependent Variable: TSS Media Minyak			
F	df 1	df 2	Sig.
.513	7	16	.812

Tabel. 10 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		TSS Media Minyak
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.024121
	Std. Deviation	.0058634
Most Extreme Differences	Absolute	.126
	Positive	.094
	Negative	-.126
Kolmogorov -Smirnov Z		.616
Asymp. Sig. (2-tailed)		.843

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tabel. 11 Analisis Ragam

ANOVA					
Dependent Variable: TSS Media Minyak					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Media	.0005964	3	.000198792	2592.933	.000
Waktu	.0001659	1	.000165900	2163.918	.000
Media * Waktu	.0000272	3	.000009079	118.426	.000
Error	.0000012	16	.000000077		
Total	.0007907	23			

Tabel 12. Uji Tukey Kadar TSS

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M 30 48	0.01293	a
M 20 48	0.01950	b
M 30 24	0.02080	c
M 10 48	0.02430	d
M 20 24	0.02620	e
M 10 24	0.02827	f
Kontrol 48	0.02923	g
Kontrol 24	0.03173	h

7. Uji kadar Lemak

- Timbang sampel ± 10 gram, bungkus dengan kertas saring, kemudian masukan ke dalam *soxhlet* yang sudah diset dengan memakai pelarut *petroleum eter*.
- Labu *soxhlet* dipanaskan sehingga mencapai 6 siklus.
- Pelarut dan lemak yang berada dalam labu *soklet*, dimasukan ke dalam cawan porselen yang sudah di konstantkan (A).
- Kemudian dipanaskan diatas penangas air sampai kering, setelah itu dimasukan ke dalam oven dan dipanaskan pada suhu 105°C selama 2 jam
- Seterusnya masukan ke dalam *eksikator* selama 30 menit, timbang (B). Selanjutnya dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Mg Lemak per litter} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Volume contoh uji, ml}}$$

Keterangan : A adalah berat kertas saring + residu kering (mg)

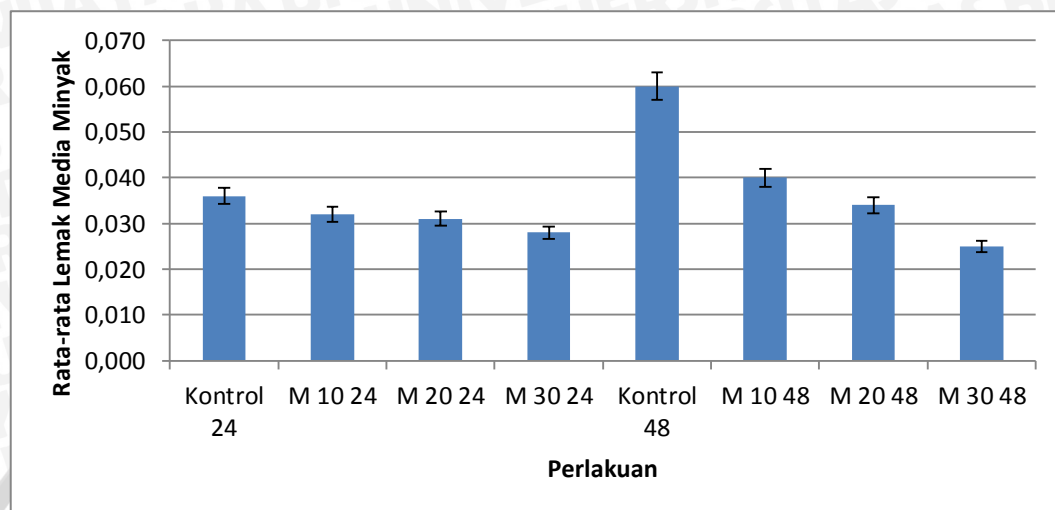
B adalah berat kertas saring (mg)

8. Hasil uji kadar Lemak

Tabel. 13 Hasil uji Lemak

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	Stdev
	1	2	3			
Kontrol 24	0.037	0.036	0.035	0.108	0.036	0.0010
M 10 24	0.029	0.032	0.035	0.096	0.032	0.0030
M 20 24	0.031	0.029	0.033	0.093	0.031	0.0020
M 30 24	0.025	0.031	0.028	0.084	0.028	0.0030
Kontrol 48	0.06	0.05	0.07	0.180	0.060	0.0100
M 10 48	0.04	0.039	0.041	0.120	0.040	0.0010
M 20 48	0.031	0.036	0.035	0.102	0.034	0.0026
M 30 48	0.021	0.028	0.026	0.075	0.025	0.0036

Gambar 5. Diagram hasil kadar Lemak



Tabel 14. Uji Homogenitas

Dependent Variable: Lemak Media Minyak

F	df 1	df 2	Sig.
1.974	7	16	.123

Tabel 15. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Lemak Media Minyak
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.035750
	Std. Deviation	.0109396
Most Extreme Differences	Absolute	.205
	Positive	.205
	Negative	-.121
Kolmogorov-Smirnov Z		1.002
Asymp. Sig. (2-tailed)		.268

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tabel 15. Analisis Ragam

ANOVA					
Dependent Variable: Lemak Media Minyak					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Media	.00148	3	.0004925	27.361	.000
Waktu	.00038	1	.0003840	21.333	.000
Media * Waktu	.00060	3	.0002010	11.167	.000
Error	.00029	16	.0000180		
Total	.00275	23			

Tabel 16. Uji *Tukey* Kadar Lemak

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M 30 48	0.025	a
M 30 24	0.028	ab
M 20 24	0.031	abc
M 10 24	0.032	abc
M 20 48	0.034	bcd
Kontrol 24	0.036	cd
M 10 48	0.040	d
Kontrol 48	0.060	e