

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya ada tiga kategori bahan; bahan utama, bahan isolat bakteri dan bahan kimia atau reagen untuk pengujian kualitas air limbah. Bahan utama yang digunakan yaitu sampel air limbah pembekuan ikan cakalang dari PT Chamin Jaya Internasional, Kecamatan Driyorejo, Kabupaten Gresik, Provinsi Jawa Timur. Bahan yang digunakan dalam pembiakan bakteri antara lain: biakan murni bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter gergoviae*, *Bacillus megenterium*, *Nitrococcus.sp*, dan *Pseudomonas putida* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang; media pertumbuhan bakteri berupa *Trypticase Soy Broth* (TSB) serta aquadest. Bahan kimia yang digunakan untuk pengujian kualitas air limbah yaitu $K_2C_2O_7 = HgSO_4$; $H_2SO_4 = HgSO_4$; KHP (Kalium Hidrogen Ptalat); DPD (Dhiponil Pospat); Chlorin; buffer; n-Heksan; HCl; Natrium sulfat; Aquades jenuh oksigen; $MgSO_4$; $CaCl_2$; Hidrofosfat; $FeCl_3$; H_2SO_4 0,04 N; NaOH 6 N; Buffer Borat; reagen fenol; sodium nitroprusida; sodium nitroklorit; alkali sitrat; larutan oksida, NaOH 1 N, natrium dihidrogen fosfat. Aseton nitryl (ACN), dan cairan OPT (orto pital dehyde).

3.1.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini menurut kegunaannya terdapat tiga kategori diantaranya peralatan aerasi, peralatan pembiakan bakteri dan peralatan uji kualitas air limbah. Pada proses aerasi alat-alat yang digunakan yaitu aerator, selang aerator, kran, pemecah udara, toples volume 2 L, spuit, kain

kasa, dan kamera. Peralatan pembiakan bakteri antara lain: tabung reaksi, erlenmeyer, pipet volume, beakerglass, autoklaf, incase, bola hisap, bunsen, botol cuffet, gelas ukur dan pipet serologis. Sedangkan peralatan yang digunakan pada uji kualitas air limbah adalah hot plate, magnetic stirrer, gelas ukur, wadah air pengencer, wadah bahan kimia ($MgSO_4$, $CaCl_2$, Hidrofosfat, $FeCl_3$), wadah bakteri, inkubator, spektrofotometer Uv-Vis, pH meter, timbangan analitik, oven, desikator, vacum Pam penyaring solid, labu didih, labu pisa, destilator horizontal, cawan porselin, labu ukur 15 mL, cuvet, vapodest, botol kaca, pipet transfer, micro tube, vortex mixer, dan sentrifuge.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kasual antara variabel yang diselidiki (Suryabrata, 1992). Penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan dilaboratorium karena alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding (Singarimbun dan Effendi, 1983). Menurut Nazir (1988), tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen.

Rancangan Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok dengan membandingkan antara kelompok perlakuan dengan kontrol. Adapun bakteri yang dikombinasikan meliputi : A+B+C+M1 = Penambahan kombinasi bakteri (*Acinetobacter baumannii* + *Bacillus subtilis* + *Enterobacter gergoviae* + *Bacillus megaterium*), A+B+C+M2 = Penambahan kombinasi bakteri

(*Acinetobacter baumannii*+ *Bacillus subtilis* + *Enterobacter gergoviae* + *Nitrococcus sp*), A+B+C+M3 = Penambahan kombinasi bakteri (*Acinetobacter baumannii*+ *Bacillus subtilis* + *Enterobacter gergoviae* + *Pseudomonas putida*). Pengamatan dan pengujian dilakukan selama 10 hari dengan selang waktu 5 hari, yaitu 0 hari = hari ke 0, 5 hari = hari ke 5, dan 10 hari = hari ke 10. Rancangan penelitian tentang pengolahan limbah cair pembekuan ikan cakalang dengan penambahan kombinasi bakteri (*Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter gergoviae*, *Bacillus megantherium*, *Nitrococcus sp*, dan *Pseudomonas putida*) secara aerob dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan percobaan bentuk RAK

Jenis Kombinasi Bakteri	Blok Pengamatan		
	0 Hari	5 Hari	10 Hari
A+B+C+M1	A+B+C+M1(0)	A+B+C+M1(5)	A+B+C+M1(10)
A+B+C+M2	A+B+C+M2(0)	A+B+C+M2(5)	A+B+C+M2(10)
A+B+C+M3	A+B+C+M3(0)	A+B+C+M3(5)	A+B+C+M3(10)

Keterangan :

A+B+C+M1 : kombinasi bakteri *Acinetobacter baumannii* + *Bacillus subtilis* + *Enterobacter gergoviae* + *Bacillus megantherium*

A+B+C+M2 : kombinasi bakteri *Acinetobacter baumannii* + *Bacillus subtilis*+ *Enterobacter gergoviae* + *Nitrococcus. sp*

A+B+C+M3 : kombinasi bakteri *Acinetobacter baumannii* + *Bacillus subtilis* + *Enterobacter gergoviae*+ *Pseudomonas putida*

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pengambilan Sampel Limbah Cair

Limbah cair yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari limbah cair pembekuan ikan cakalang di PT. Chamin Jaya Internasional Kabupaten Gresik, Jawa Timur. Sampel tersebut diambil langsung dari proses pencucian pertama dan kedua yang terdapat pada bak penampungan pada ikan cakalang. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam jerigen berukuran 30 liter. Setelah itu, sampel yang sudah dimasukkan ke dalam jerigen dibawa ke laboratorium dengan menggunakan *coolbox* yang telah diberi es batu. Fungsi pemberian es batu dalam *coolbox* yaitu untuk menjaga suhu sampel tetap dingin agar kandungan bahan kimia organik di dalamnya tidak meningkat selama proses transportasi menuju Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

3.3.2. Pemiakan Bakteri

Pemiakan bakteri dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada proses pemiakan bakteri pertama dilakukan sterilisasi alat. Menurut Pelczar dan Chan (1988), sterilisasi merupakan proses yang menghancurkan semua bentuk kehidupan. Suatu benda yang steril dipandang dari sudut mikrobiologi, artinya bebas dari mikroorganisme hidup. Sterilisasi yang banyak dilakukan saat ini yaitu sterilisasi yang menggunakan uap panas dengan suhu dan tekanan yang tinggi dalam autoklaf. Autoklaf mampu membunuh mikroba dengan suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm (Nick,1999). Pada penelitian ini alat yang perklu dilakukan sterilisasi antara lain : cawan petri, tabung reaksi, dan pipet volume. Tujuan dilakukannya sterilisasi pada alat tersebut adalah untuk menghindari kontaminasi silang oleh mikroorganisme selama proses pemiakan bakteri.

Dalam penelitian ini sterilisasi yang dilakukan dengan menggunakan alkohol 70%. Alat yang akan disterilisasi yaitu laminaran, disterilisasi dengan cara menyemprotkan cairan aseptis tersebut pada bagian dalamnya, kemudian dikeringkan dengan menggunakan tissue atau serbet agar aseptis. Setelah itu, kaca laminaran ditutup dan menekan tombol UV untuk menyalakan sinar UV pada laminaran selama 1 jam yang berfungsi sebagai pensteril laminaran. Sambil menunggu laminaran disterilkan selama 1 jam, dilakukan pembuatan media TSB yang digunakan untuk berkembangbiaknya bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter gergoviae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megantherium*, *Nitrococcus sp*, dan *Pseudomonas putida*. Pertama, timbang serbuk TSB sebanyak 3,6 gr dengan menggunakan timbangan digital. Kemudian TSB dimasukkan ke dalam beaker glass 500 ml dan diberi aquades sebanyak 120 ml, lalu diaduk hingga homogen dengan menggunakan spatula. Setelah itu, media TSB cair tersebut dimasukkan dalam 6 tabung reaksi bertutup, masing-masing tabung reaksi tersebut diisi sebanyak 40 ml. tabung reaksi bertutup yang berisi media cair tersebut, disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, kemudian media cair tersebut didiamkan sampai dingin untuk mencegah botol pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut.

Setelah 1 jam sinar UV pada laminaran dimatikan, lalu lampu yang pada laminaran dinyalakan untuk mempermudah penglihatan saat penanaman bakteri. Saat penanaman bakteri, tangan yang telah dipasang sarung tangan dan juga pada bagian dalam laminaran disemprot dengan cairan aseptis agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Kemudian bunsen yang telah dinyalakan diletakkan dalam laminaran beserta media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi dan isolat murni bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter gergoviae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megantherium*, *Nitrococcus sp*, dan *Pseudomonas putida*.

Setelah itu, diambil sampel bakteri yang akan diremajakan, dibuka tutup tabung reaksi sambil dipanaskan diatas Bunsen agar kondisinya tetap aseptis. Osse yang akan digunakan untuk mengambil bakteri, disemprot terlebih dahulu dengan menggunakan alkohol 70% dan dipanaskan diatas Bunsen untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Osse kemudian disentuhkan di media isolate bakteri untuk mengurangi panas dari osse agar bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya, mengambil sebanyak 1 osse bakteri dengan cara menggosokkan isolat dan dimasukkan ke dalam media cair baru yang telah disiapkan. Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, segera dipanaskan lagi diatas Bunsen bagian permukaan tabung reaksinya dan segera ditutup. Bagian ujung osse yang telah digunakan, lalu dipanaskan lagi diatas Bunsen agar kembali aseptis saat digunakan untuk mengambil isolat bakteri yang lain. Tabung reaksi dikocok-kocok agar bakteri dapat homogen dengan media cair, lalu diinkubator dalam suhu 37 °C selama 18-24 jam. Setelah diinkubator, dilihat ada atau tidak endapan pada media, jika terdapat endapan maka pembiakan bakteri telah berhasil dilakukan. Tabung reaksi diberi label nama bakteri yang telah berhasil dibikikan agar tidak terjadi kesalahan pada saat perlakuan aerasi. Dilakukan langkan pembiakan yang sama terhadap isolat murni bakteri yang lain.

3.3.3. Pengenceran Bakteri

Proses pengenceran bakteri bertujuan untuk mengurangi kepadatan mikroba yang akan ditanam (Ferdiaz, 1993). Karena bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba tiap mili, per gram atau per cm dipermukaan memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan

pada media agar didalam cawan petri, sehingga setelah diinkubasi akan terbentuk koloni dalam jumlah yang dapat dihitung. Ditambahkan oleh Dwijosaputro (1989), tujuan pengenceran adalah untuk mendapatkan satu koloni murni dan selanjutnya koloni yang didapat akan dijadikan piaraan murni.

Sebelum dilakukan proses pengenceran pertama dilakukan penimbangan serbuk NaCl menggunakan timbangan digital sebanyak 1,62 gram. Serbuk NaCl dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 180 ml. Kemudian larutan NaCl dipindahkan kedalam tabung reaksi masing – masing sebanyak 10 ml dan disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media pengenceran. Karena pengenceran dilakukan hingga 10^{-6} dari 4 bakteri (*Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter gergoviae*, *Bacillus megenterium*, *Nitrococcus sp*, dan *Pseudomonas putida*) dan dilakukan satu kali pengenceran maka hanya dibutuhkan 24 tabung reaksi.

Untuk tahapan pengenceran, bakteri yang telah diinkubasi dan diremajakan dalam media TSB. Diambil masing – masing bakteri sebanyak 1 ml dengan pipet volum dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl dan dicatat sebagai pengenceran 10^{-1} . Kemudian dari pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 ml dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-6} , dan didapatkan hasil bakteri dengan kepadatan 10^{-6} .

3.3.4. Pemasangan Aerator

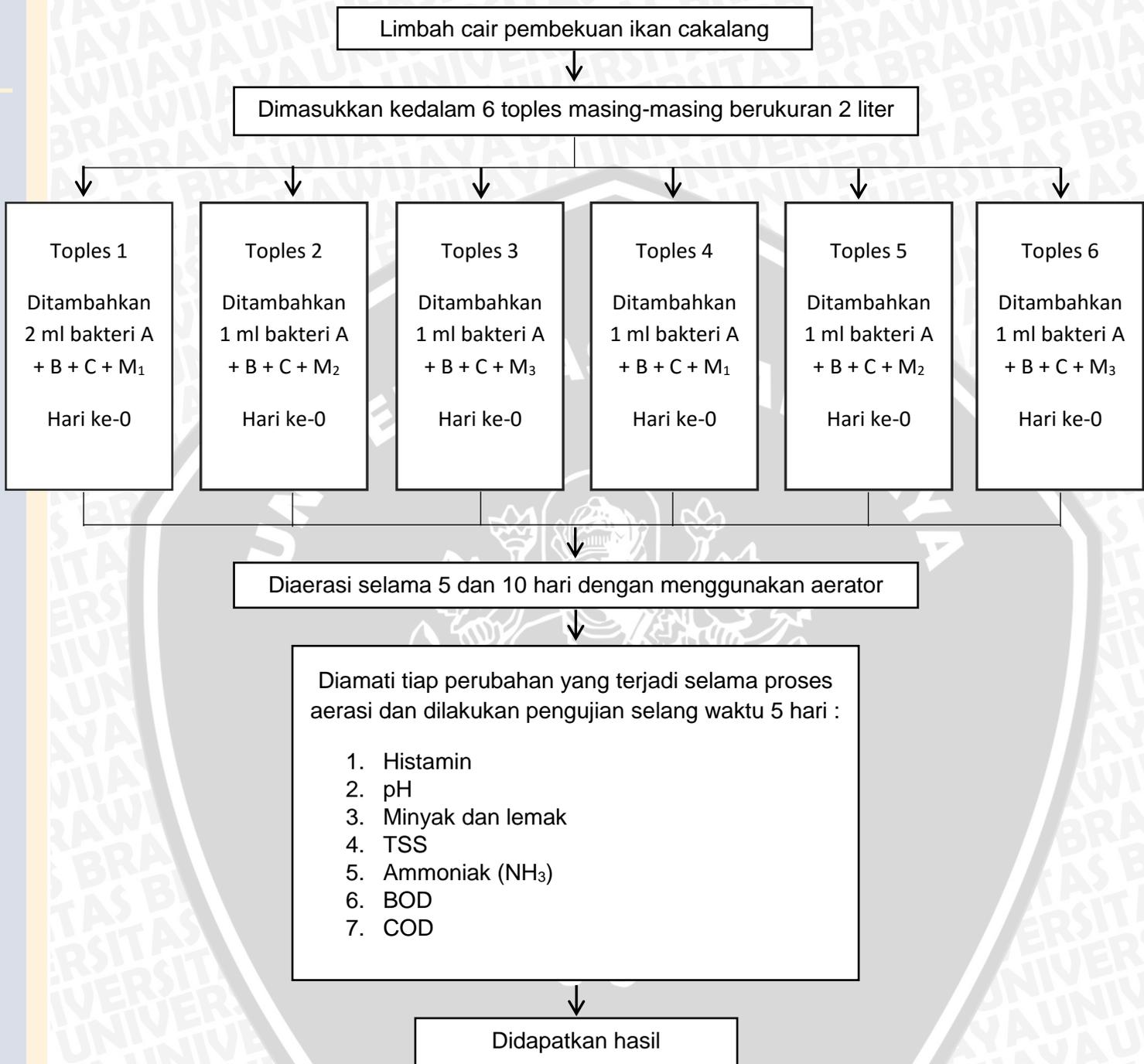
Pemasangan aerator pada penelitian ini bertujuan untuk memberikan *supply* oksigen (O_2) ke dalam limbah cair yang kemudian akan digunakan oleh bakteri aerob yang ditambahkan ke dalamnya untuk proses metabolisme atau

proses pertumbuhannya. Adapun tahapan pemasangan aerator adalah sebagai berikut:

- Aerator, selang, kran, pemecah udara dan toples dirangkai sedemikian rupa
- Setiap toples diberi label sesuai dengan jenis *treatment* yang akan digunakan
- Sampel limbah cair dimasukkan ke dalam toples masing-masing sebanyak 2 liter
- Selang aerator yang telah dilengkapi dengan kran dan pemecah udara di masukkan atau dipasangkan ke dalam toples
- Rekatkan selang dengan menggunakan selotip pada toples jika dibutuhkan agar selang tidak bergeser

Tahapan penambahan bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter gergoviae*, *Bacillus megantherium*, *Nitrococcus.sp*, dan *Pseudomonas putida* dalam limbah cair adalah sebagai berikut:

- Setelah melakukan pembiakan bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter gergoviae*, *Bacillus megantherium*, *Nitrococcus.sp*, dan *Pseudomonas putida* dalam media cair TSB, bakteri tersebut dimasukkan ke dalam limbah cair sesuai dengan *treatment*
- Bakteri dimasukkan dengan menggunakan spuit steril sebanyak 1% dari total volume sampel tiap toples. Dilakukan penambahan bakteri sebanyak 1% karena pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ishartanto (2009), pada dosis bakteri 1% tersebut sudah dapat mereduksi bahan organik pada limbah cair.
- Kemudian dilakukan uji parameternya setiap 5 hari sekali selama 10 hari.



Gambar 8. Prosedur Kerja Aerasi Limbah Cair

3.4. Analisa Beberapa Parameter Uji

3.4.1. Analisa Histamin

Analisa histamin dilakukan sebelum sampel limbah diberi perlakuan bakteri dan sesudah diberi perlakuan bakteri. Setelah sampel limbah yang diberi perlakuan bakteri diaerasi selama 5 hari dan 10 hari, maka dilakukan pengujian kadar histamin menggunakan metode spektrofotometri. Prosedur kerja analisis kadar histamin berdasarkan SNI 2345. 10:2009 dalam Affiano (2011) terdiri atas tiga tahap, yaitu sebagai berikut :

➤ Tahap ekstraksi

Sepuluh ml sampel ditimbang lalu ditambahkan dengan methanol sebanyak 50 ml kemudian dihomogenkan dengan *homogenizer* (blender) kurang lebih selama 1-2 menit. Sampel yang sudah dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 60 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambahkan methanol sampai tanda tera lalu dikocok agar homogen. Setelah itu, larutan sampel disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Filtrat dari hasil penyaringan akan digunakan pada proses *clean up*.

➤ Tahap *clean up* atau tahap elusi

Pertama disiapkan kolom kromatografi (panjang 20 cm dan diameter 7 mm) kemudian ke dalam kolom tersebut dimasukkan *glass wool* secukupnya (tingginya 1 cm). Selanjutnya resin penukar ion (*dowex 1-x800-100-mesh*) dimasukkan ke dalam kolom sampai tingginya kurang lebih 8 cm (diusahakan resin tidak sampai kering dengan cara dibilas dengan akuades karena akan mempengaruhi daya kerja penukar ion tersebut). Selanjutnya sampel filtrat hasil penyaringan pada tahap ekstraksi dilewatkan ke dalam kolom sebanyak 1 ml dan ditampung hasilnya dalam labu ukur yang telah diberi 5 ml HCl 1 N.

➤ Tahap pembentukan

Sebanyak 10 ml HCl 0,1 N dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 ml sampel hasil tahap *celan* up/elusi, 5 ml standar histamin (sebagai larutan standar), dan 5 ml HCl 0,1 N (sebagai blanko). Setelah itu, ditambahkan 3 ml NaOH 1 N ke dalam tabung reaksi lalu dihomogenkan dan dibiarkan selama 5 menit. Kemudian ditambahkan lagi *orto*ptalatdikarboksilaldehyde (OPT) 1% sebanyak 1 ml lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 4 menit. Selanjutnya ditambahkan 3 ml H₃PO₄ 3,57 N dan dihomogenkan. Setelah selesai, sampel yang telah melalui tahap pembentukan siap untuk dibaca menggunakan spektrofлуorometer pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan panjang gelombang emisi 444 nm. Rumus perhitungan kadar histamin (ppm) adalah sebagai berikut :

$$\text{Histamin (ppm)} = \frac{\left(\frac{\text{IU sampel}-A}{B}\right) \times Fp}{\text{bobot sampel}}$$

Keterangan :

IU = Absorban sampel

A = Intersep

B = Slope

Fp= Faktor pengencer

3.4.2. Analisa pH

Analisa pH pada sampel limbah yang telah diberi perlakuan bakteri dan diaerasi selama 5 hari dan 10 hari duji dengan menggunakan pH meter, analisis ini dilakukan di laboratorium Kualitas Air Jasa Tirta Malang . Menurut SNI 06-6989.11-2004 prinsip cara uji derajat keasaman (pH) dengan menggunakan alat pH meter adalah sebuah metode pengukuran pH berdasarkan pengukuran

aktifitas ion hidrogen secara potensiometri/elektrometri dengan menggunakan pH meter.

Berikut ini merupakan prosedur pengukuran pH dengan menggunakan pH meter berdasarkan SNI 06-6989.11-2004 adalah sebagai berikut :

- pH meter dikalibrasi menggunakan buffer standar pH 4 dan 7
- Dituangkan limbah ke dalam piala gelas 250 ml
- Dichelupkan elektroda pH meter ke dalam larutan limbah
- Ditunggu sampai pembacaan nilai pH stabil yang terlihat pada layar pH meter *Fisher Scientific* terdapat tulisan "STABLE"
- Dicatat pH dan suhu limbah

3.4.3. Analisis TSS

Analisa TSS (*Total Suspended Solid*) ini dilakukan di laboratorium Kualitas Air Jasa Tirta Malang, pengujian ini dilakukan setelah sampel limbah diberi perlakuan bakteri dan diaerasi selama 5 hari dan 10 hari. Prosedur uji kadar TSS berdasarkan SNI 06-6989.3-2004 adalah sebagai berikut:

- Persiapan pengukuran TSS
 - a) Kertas saring diletakkan pada peralatan filtrasi. Vakum dan wadah pencuci dipasang dengan air suling berlebih 20 mL. Vakum dinyalakan untuk menyedot dengan tujuan menghilangkan semua sisa air. selanjutnya vakum dimatikan, dan menghentikan pencucian.
 - b) Kertas saring dipindahkan dari peralatan filtrasi ke cawan *Gooch* agar dapat langsung dikeringkan.
 - c) Kertas saring dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam dan selanjutnya kertas saring didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang.

- Prosedur pengukuran TSS
 - a) Kertas saring diletakkan pada peralatan filtrasi. Selanjutnya, dilakukan penyaringan dengan peralatan vakum. Kertas saring dibasahi dengan sedikit air suling sebelum sampel dituang.
 - b) Sampel uji diaduk dengan pengaduk magnetik agar sampel uji lebih homogen.
 - c) Setelah homogen, sampel dipipet dengan volume tertentu pada waktu sampel diaduk dengan pengaduk magnetik.
 - d) Cuci kertas saring atau saringan dengan 3 x 10 mL air suling, biarkan kering sempurna, dan lanjutkan penyaringan dengan vakum selama 3 menit agar diperoleh penyaringan sempurna. Sampel uji dengan padatan terlarut yang tinggi memerlukan pencucian tambahan.
 - e) Pindahkan kertas saring secara hati-hati dari peralatan penyaring dan pindahkan ke wadah timbang aluminium sebagai penyangga. Jika digunakan cawan *Gooch* pindahkan cawan dari rangkaian alatnya.
 - f) Keringkan kertas saring dalam oven setidaknya selama 1 jam pada suhu 103°C sampai dengan 105°C, dinginkan dalam desikator untuk menyeimbangkan suhu dan timbang.

3.4.4. Analisa Minyak

Analisa minyak sampel limbah cair dilakukan di laboratorium Kualitas Air Jasa Tirta Malang. Sampel yang dianalisa ini terlebih dahulu diaerasi selama 5 hari dan 10 hari, kemudian dianalisa untuk mengetahui kadar minyak dalam limbah setelah diaerasi. Prosedur analisa minyak berdasarkan SNI 06-6989.10-2004 adalah sebagai berikut:

- Dimasukan sampel limbah ke corong pisah dan ditentukan volumenya (ditandai botol sampel pada meniscus air atau timbangan berat sampel)
- Dibilas botol sampel dengan 30 ml pelarut organik dan tambahkan pelarut pencuci ke dalam corong pisah
- Dikocok dengan kuat selama 2 menit, lalu dibiarkan lapisan memisah
- Dikeluarkan lapisan pelarut melalui corong yang telah dipasang kertas saring dan 10 g Na_2SO_4 anhidrat yang keduanya telah dicuci dengan pelarut, ke dalam labu bersih yang telah ditimbang
- Jika tidak terdapat lapisan pelarut yang jernih dan terdapat emulsi lebih dari 5 ml, dilakukan sentrifugasi selama 5 menit pada putaran 2400 rpm. Dipindahkan bahan yang disentrifugasi ke corong pisah dan dikeringkan lapisan pelarut melalui corong dengan kertas saring dan 10 g Na_2SO_4 yang keduanya telah dicuci sebelumnya, ke dalam labu bersih yang telah ditimbang
- Digabungkan lapisan air dan emulsi sisa atau padatan dalam corong pisah. Ekstraksi 2 kali lagi dengan pelarut 30 ml tiap kalinya.
- Digabungkan ekstrak dalam labu destilasi yang telah ditimbang, termasuk cucian terakhir dari saringan dan Na_2SO_4 anhidrat dengan tambahan 10 ml sampai dengan 20 ml pelarut
- Destilasi pelarut dalam peangas air pada suhu 85°C .
- Saat terlihat kondensasi pelarut berhenti, pindahkan labu dari penangas air. didinginkan salam desikator selama 30 menit pastikan labu kering dan timbang sampai diperoleh berat tetap.

3.4.5. Analisa Ammonia

Analisa ammonia dilakukan di laboratorium Kualitas Air Jasa Tirta Malang, sampel limbah diuji setelah dilakukan aerasi selama 5 hari dan 10 hari dengan menggunakan metode fenat atau spektrofotometri. Prinsip analisa ammonia berdasarkan SNI 06-6989(1).30-2005 adalah ammonia bereaksi dengan hipoklorit dan fenol yang dikatalisis oleh natrium nitroprusida membentuk senyawa biru indofenol. Prosedur kerja analisa ammonia berdasarkan 06-6989(1).30-2005 adalah sebagai berikut:

- a. Dipipet 25 ml sampel uji masukkan ke dalam erlenmeyer 50 mL;
- b. Ditambahkan 1 mL larutan fenol, dihomogenkan;
- c. Ditambahkan 1 mL natrium nitroprusid, dihomogenkan;
- d. Ditambahkan 2,5 mL larutan pengoksidasi, dihomogenkan;
- e. Ditutup erlenmeyer tersebut dengan plastik atau parafin film;
- f. Dibiarkan selama 1 jam untuk pembentukan warna;
- g. Dimasukan ke dalam kuvet pada alat spektrofotometer, dibaca dan dicatat hasil panjang gelombang 640 nm.

3.4.6. Analisa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*)

Prosedur uji kebutuhan oksigen biokimia (*Biochemical Oxygen Demand*/ BOD) menurut SNI 6989.72:2009. Prinsip uji BOD yaitu sejumlah contoh uji ditambahkan kedalam larutan pengencer jenuh oksigen yang telah ditambah larutan nutrisi dan bibit mikroba, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari. Bahan kontrol standar dalam uji BOD ini menggunakan larutan glukosa asam glutamat. Adapun prosedur uji BOD adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan 2 buah botol DO, tandai masing-masing botol dengan notasi A1;A2
- b. Masukkan larutan contoh uji (4.4, 2.4) ke dalam masing-masing botol DO A1 dan A2; sampai meluap, kemudian tutup masing-masing botol secara hati-hati untuk menghindari terbentuknya gelembung udara
- c. Lakukan pencocokan beberapa kali, kemudian tambahkan air bebas mineral pada sekitar mulut botol DO yang telah ditutup
- d. Simpan botol A2 dalam lemari inkubator $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari
- e. Lakukan pengukuran oksigen terlarut terhadap larutan dalam botol A1 dengan alat DO meter yang terkalibrasi sesuai dengan *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st Edition*, 2005. Hasil pengukuran merupakan nilai oksigen terlarut nol hari (A1). Pengukuran oksigen terlarut pada nol hari harus dilakukan paling lama 30 menit setelah pengenceran
- f. Ulangi pengerjaan butir e) untuk botol A2 yang telah diinkubasi 5 hari
- g. Lakukan pengerjaan butir a) sampai f) untuk penetapan blanko dengan menggunakan larutan pengencer tanpa contoh uji
- h. Lakukan pengerjaan butir a) sampai f) untuk penetapan kontrol standar dengan menggunakan larutan glukosa-asam glutamat.

3.4.7. Analisa COD (*Chemical Oxygen Demand*)

Prosedur uji kebutuhan oksigen kimia (*Chemical Oxygen Demand*/COD) dengan refluks tertutup secara spektrofotometri berdasarkan SNI 06-6989.2-2004. Prinsip uji COD adalah jumlah oksidan $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ yang bereaksi dengan contoh uji dan dinyatakan sebagai mg O_2 untuk setiap 1000 mL contoh uji. Adapun prosedur pengujian COD adalah sebagai berikut :

- a. Dinginkan perlahan-lahan contoh yang sudah direluks sampai suhu ruang untuk mencegah terbentuknya endapan
- b. Biarkan suspensi mengendapnya dan pastikan bagian yang akan diukur benar-benar jernih.
- c. Ukur contoh larutan standar pada panjang gelombang yang telah ditentukan (420 nm atau 600 nm)
- d. Pada panjang gelombang 600 nm, gunakan blanko yang tidak direluks sebagai larutan referensi
- e. Jika konsentrasi COD lebih kecil atau sama dengan 90 mg/L lakukan pengukuran pada panjang gelombang 420 nm, gunakan pereaksi air sebagai larutan referensi
- f. Ukur absorbansi blanko yang tidak direluks yang mengandung dikromat, dengan pereaksi air sebagai pengganti contoh uji
- g. Perbedaan absorbansi antara contoh yang direluks dan yang tidak direluks adalah pengukuran COD contoh uji
- h. Plot perbedaan absorbansi antara blanko yang direluks dan absorbansi larutan standar yang direluks terhadap nilai COD untuk masing-masing standar
- i. Lakukan analisa duplo