

### 3. METODOLOGI

#### 3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang menggunakan metode deskriptif. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang diarahkan untuk memberikan gejala-gejala, fakta-fakta, atau kejadian-kejadian secara sistematis dan akurat, menegenai sifat-sifat populasi atau daerah tertentu. Dalam penelitian deskriptif cenderung tidak perlu mencari atau menerangkan saling hubungan dan menguji hipotesis (Zuriah, 2006).

Penelitian deskriptif merupakan penelitian yang dimaksudkan untuk mengumpulkan informasi mengenai status suatu gejala yang ada, yaitu keadaan gejala menurut apa adanya pada saat penelitian dilakukan. Penelitian deskriptif bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena, dalam penelitian ini tidak dimaksudkan untuk menguji hipotesis tertentu tetapi hanya menggambarkan apa adanya suatu variabel, gejala atau keadaan (Susilana, 2005). Pada penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu tahap 1 dan tahap 2.

##### 3.1.1 Penelitian Tahap 1

Penelitian tahap pertama yaitu pembiakan bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, dan *Enterobacter gergoviae*. Bakteri tersebut merupakan bakteri mangrove yang berasal dari pasuruan. Stok bakteri didapatkan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Sebelum dilakukan pembiakan bakteri hal yang dilakukan sebelumnya yaitu sterilisasi alat. Tujuan dari Sterilisasi adalah untuk menghindari kontaminasi silang oleh mikroorganismenya selama proses pembiakan bakteri. Alat-alat disterilisasi menggunakan uap panas pada suhu dan tekanan yang tinggi di

dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Alat yang dilakukan sterilisasi antara lain : cawan petri, tabung reaksi, dan pipet volume.

Tahap berikutnya yaitu reisolasi dari stok kultur *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergoviae*. Metode yang digunakan adalah metode striking kuadran. Reisolasi bertujuan untuk memastikan ada tidaknya kontaminasi agar didapatkan koloni murni . Kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian dilakukan pewarnaan gram secara mikroskopis. Selanjutnya didapatkan biakan murni, dari kuadran IV diambil satu hingga dua koloni menggunakan jarum osse dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium cair TSB dengan volume 10 mL. Kemudian dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C. Indikasi koloni bakteri tumbuh pada media cair TSB yaitu media akan berwarna lebih keruh.

Tahap selanjutnya yaitu pewarnaan gram untuk memastikan ada atau tidak cemaran pada koloni. Cara pewarnaan gram yang pertama adalah pembuatan preparat untuk pewarnaan, disiapkan kaca objek dan panaskan diatas nyala api spirtus untuk membebaskanya dari lemak, lalu diambil satu koloni bakteri dengan jarum ose steril lalu diratakan pada kaca objek. Selanjutnya digoyang-goyangkan didekat nyala api spirtus hingga kering. Kemudian dilakukan tahap pewarnaan, pada preparat yang kering ditetesi dengan kristal violet, alkohol 96%, dan amonium oksalat, yang didiamkan selama satu menit lalu larutan pewarna tersebut dibuang kemudian di tetesi dengan iodium, kaliumiodida, dan akuadest diamkan selama satu menit, setelah itu buang larutan tersebut dan cuci. Kemudian preparat ditetesi dengan acetone alkohol hingga warna tepat dihilangkan kurang lebih selama 30 detik, lalu tetesi dengan safranin, alkohol 96%, dan akuadest diamkan selama satu menit kemudian cuci dan keringkan pada suhu ruang. Selanjutnya amati preparat

dibawah mikroskop. Jika hasil yang didapatkan tidak terdapat kontaminasi atau cemaran, dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm untuk mendapatkan nilai OD 0,1 atau  $10^8$ . Setelah didapat nilai OD volume biakan dihitung menggunakan rumus :

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 0,642 = 10 \text{ mL} \times 10^8$$

$$V1 = 1,56 \text{ mL}$$

Setelah didapat V1 masukkan dalam larutan NaCl 0,9% dengan volume 8,44 mL pada tabung reaksi hingga didapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^8$ . Selanjutnya dilakukan pengenceran untuk mengurangi kepadatan mikroba yang akan ditanam. Pengenceran yang diambil adalah kepadatan  $10^6$ , tahapan yang dilakukan untuk pengenceran adalah dihitung volume biakan murni bakteri dengan rumus :

$$pV1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 10^8 = 10 \text{ mL} \times 10^6$$

$$V1 = 0,1 \text{ mL}$$

Setelah didapat pengenceran kepadatan  $10^6$  adalah 0,1 mL, volume larutan NaCl yang dibutuhkan adalah 9,9 mL. Sehingga pada setiap 9.9 mL NaCl ditambahkan 0.1 mL satu spesies bakteri.

### 3.1.2 Penelitian Tahap 2

Penelitian tahap 2 dilakukan penanganan limbah cair industri pembekuan ikan cakalang dengan cara menambahkan bakteri (*Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, dan *Enterobacter gergoviae*) yang telah dikembangbiakkan pada tahap 1 yang selanjutnya diuji menggunakan parameter pH, TSS, BOD, COD Amoniak dan minyak lemak. Adapun prosedur kerja dapat dilihat pada lampiran.

## 3.2 Materi Penelitian

### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan pembiakan. Bahan utama yang digunakan adalah limbah industri pembekuan ikan cakalang yang di peroleh dari PT. Chamim Jaya Internasional Kabupaten Gresik, Jawa Timur. Bahan pembiakan adalah biakan murni bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergoviae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Media untuk pertumbuhan bakteri tersebut adalah Tryptic Soy Broth (TSB) dan bahan-bahan yang digunakan untuk pembiakan bakteri yaitu aquadest, larutan NaCl, kertas saring, tissue, air, masker, sabun cair. Bahan-bahan yang digunakan untuk pengambilan limbah cair adalah es batu dan kertas label.

Bahan-bahan yang digunakan dalam uji histamine yaitu NaOH 1N, natrium dihidrogen fosfat, asiton nitryl (CAN), dan cairan OPT (orto-ptalatdikarbosilhide). Pada uji pH bahan yang digunakan adalah aquades. Pada uji TSS bahan yang digunakan adalah kertas saring dan aquadest. Pada uji minyak dan lemak bahan yang digunakan yaitu n-heksan, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, aquadest, dan kertas saring. Pada uji Amonia bahan yang digunakan yaitu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,04 N, NaOH 6 N, buffer borat, sodium nitroprisida, sodium nitrokolit, reagen fenol, larutan oksida, alkali sitrat, dan aquadest.

### 3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas peralatan aerasi, peralatan pembiakan dan pengenceran bakteri dan peralatan pengujian kualitas. Alat-alat yang digunakan untuk aerasi terdiri dari toples 2,5 L, selang, aerator dan pipa. Alat-alat yang digunakan untuk pembiakan dan pengenceran

bakteri adalah laminaran flow, tabung reaksi, kulkas, gelas arloji, rak tabung reaksi, pipet volum, beaker glass, timbangan digital, jarum oase, Erlenmeyer, laminaran, gelas ukur, spatula, Bunsen, botol semprot, nampan, incubator dan autoklaf. Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel limbah cair ikan cakalang yaitu coolbox dan jurigen 30 liter.

Alat-alat yang digunakan untuk uji histamine adalah pipet transfer, mikro tube, vortex mixer, sentrifuge dan HPLC. Alat yang digunakan pada Uji pH adalah pH meter. Alat yang digunakan pada uji TSS adalah timbangan analitik, oven, desikator, vacuum Pam penyiring solid, dan cawan porselin. Alat uji minyak dan lemak adalah labu didih, labu pisa, timbangan analitik, oven, corong, desikator, dan destilator horizontal. Pada uji ammonia alat yang digunakan adalah pipet volum, pipet tetes, spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu ukur 15 ml, cuvet botol kaca dan vapodest.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Pengambilan Sampel Cair

Limbah cair yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari PT. Chamim Jaya Internasional Kabupaten Gresik, Jawa Timur diambil pukul 17.00 WIB. Sampel diambil dari tempat pembuangan limbah. Sampel kemudian dimasukkan kedalam jurigen steril berukuran 30 liter. Sampel dalam jurigen dibawa menuju laboratorium. Selama proses transportasi jurigen steril dimasukkan dalam coolbox berisi es curah. Es curah tersebut berfungsi untuk mengurangi perubahan kimia secara signifikan pada limbah cair.

#### 3.3.2 Pembuatan Media Bakteri

Media yang digunakan untuk bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergovie* adalah media cair Trypticase Soya Broth

(TSB). Menurut Waluyo (2008), proses pembuatan media cair TSB adalah sebagai berikut :

- 30 gram TSB dilarutkan dalam 1 liter aquadest ditempatkan dalam Erlenmeyer
- Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas, lalu di didihkan hingga larutan sempurna dan jernih
- Media cair TSB dalam Erlenmeyer disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- Media cair TSB yang akan digunakan di dinginkan terlebih dahulu agar bakteri yang akan diinokulasi tidak mati
- Media yang sudah dingin kemudian ditambahkan biakan murni bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergovie* pada masing-masing media cair
- Media yang berisi bakteri diinkubasi dalam incase selama 24 jam

Adapun komposisi dari media TSB adalah sebagai berikut :

**Tabel 1. Komposisi media TSB**

Formula	Gram / Liter
<i>Pandreactic Digest of Casein</i>	17
<i>Papaic Digest of Soybean Meal</i>	3
<i>Sodium Chloride</i>	5
<i>Dibasic Potasium Phospat</i>	2,5
<i>Dextrose</i>	2,5

### 3.3.3 Penambahan Bakteri

Prosedur penambahan bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergovie* dalam limbah cair pembekuan ikan cakalang adalah sebagai berikut:

Disiapkan media cair TSB yang berisi bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergovie*. Media cair TSB dimasukkan kedalam

toples yang berisi limbah pembekuan ikan cakalang menggunakan pipet tetes dengan konsentrasi bakteri yang ditambahkan sebanyak 1 mL.

Tahapan pada aerasi limbah cair pembekuan ikan cakalang yaitu 2 liter limbah cair masing masing dimasukkan kedalam 6 toples berbeda. Kemudian limbah dalam toples diaerasi menggunakan aerato dengan tujuan sebagai suplai oksigen dalam limbah cair agar bakteri mampu hidup dengan optimal. Kemudian dimasukkan bakteri dengan kepadatan 10<sup>6</sup> CFU/ml sebanyak 2 ml kedalam toples.

Pada penelitian ini dosis bakteri yang digunakan sebesar 1 ml/l. Dosis tersebut telah memenuhi standart baku mutu proses pemurnian air limbah secara biologi. Pada toples pertama berisi limbah cair pembekuan ikan cakalang dengan bakteri *Acinetobacter baumannii*. Pada toples kedua berisi bakteri *Bacillus subtilis* dan pada toples ketiga berisi bakteri *Enterobacter gergoviae*.

Setelah pemberian perlakuan bakteri pada masing-masing toples, limbah cair pembekuan ikan cakalang kemudian diaerasi selama 10 hari dengan dilakukan pengujian parameter setia 5 hari sekali. Pengujian yang dilakukan adalah pengujian kadar histamin, pH, TSS, BOD, COD, minyak dan lemak dan amoniak. Perubahan yang terjadi selama proses aerasi limbah cair pembekuan ikan cakalang dapat dilihat pada lampiran.

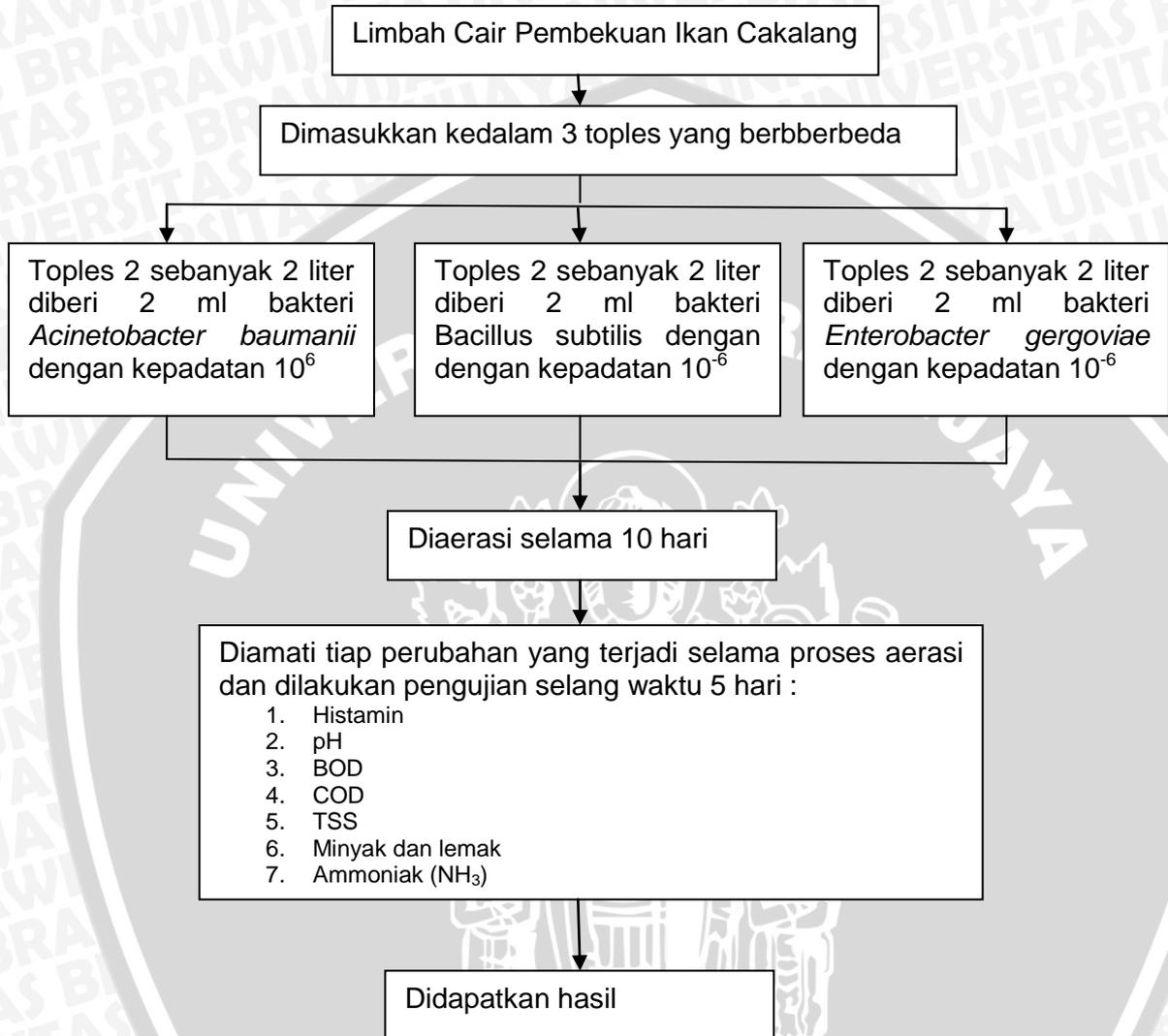
#### **3.3.4 Aerasi Limbah**

Proses Pengolahan limbah cair dengan aerasi bertujuan untuk menambahkan oksigen kedalam limbah. Adanya oksigen yang cukup, mengakibatkan bakteri dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, sehingga proses penguraian bahan organik dalam limbah akan berjalan dengan cepat. Kecukupan oksigen akan memperketat peningkatan kualitas limbah cair. (Susanto., et al, 2015)

Menurut Gunandjar (2015). Bila zat organik dihilangkan dari larutan melalui pengolahan secara proses biologi menggunakan bakteri (sel) sebagai mikroorganisme, terjadi dua fenomena dasar sebagai berikut: oksigen dikonsumsi oleh bakteri untuk memperoleh energi, dan massa sel baru terbentuk. Kebutuhan oksigen tersebut dipenuhi melalui penggelembungan udara ke dalam larutan (proses aerasi). Mikroorganisme juga mengalami auto-oksidasi secara progresif dalam massa selulernya. Reaksi tersebut digambarkan melalui persamaan sebagai berikut :



### 3.4 Skema Kerja



**Gambar 1. Skema Kerja**

### 3.5 Analisa Parameter Uji

#### 3.5.1 Analisa Histamin

Analisa histamin menggunakan metode HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) dengan prinsip mengubah zat histamine dikonversikan ke bentuk OH yang kemudian diisolasi menggunakan resin penukar ion dan diubah menjadi bentuk derivatnya dengan Ortoptalatdikarboksilaldehyde (OPT) dan diukur secara fluorometris. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam ekuivalen kadar histamin. Prosedur analisis kadar histamin menurut SNI (2009) terdiri atas dua tahap, yaitu sebagai berikut :

##### a. Prosedur analisa

- Timbang 250 ml sampel masukkan dalam beaker glass kemudian tambahkan 50 ml methanol, blender hingga homogeny
- Panaskan dalam waterbath selama 15 menit dengan suhu 600C
- Masukkan sampel dalam labu takar 100 ml
- Saring menggunakan kertas saring kemudian filter ditampung dalam botol sampel

##### b. Prosedur persiapan resin yaitu:

- Timbang 3 gram resin untuk setiap kolom dalam beaker glass 250 ml
- Tambahkan 15 ml NaOH 2 N/gr resin agar berubah menjadi OH
- Kemudian aduk dengan stirrer-plate selama 30 menit
- Tuang cairan dibagian atas dan ulangi penambahan NaOH 2 N dengan jumlah yang sama
- Bilas resin menggunakan aquadest sebanyak 3 kali bilasan
- Kemudian saring dengan kertas No. 588 atau yang setara.

### 3.5.2 Analisa pH

Analisa pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter, dimana metode ini dapat mengukur derajat keasaman (pH) air limbah dengan menggunakan alat pH meter. Prinsip pengukuran pH berdasarkan pengukuran aktifitas ion hydrogen secara potensiometri atau elektrometri. Metode tersebut dijelaskan dalam analisa menurut SNI 06-6989.11-2004 yaitu sebagai berikut:

- Pertama keringkan alat pH meter yang telah terkalibrasi menggunakan buffer standar pH 4 dan 7 dengan menggunakan tissue.
- Celupkan elektroda ke dalam contoh uji hingga pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap
- Catat hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter

### 3.5.3 Analisa BOD ( Biochemical Oxygen Demand)

Prosedur uji kebutuhan oksigen biokimia (Biochemical Oxygen Demand/ BOD) menurut SNI 6989.72:2009. Cara Uji ini digunakan untuk menentukan jumlah oksigen terlarut yang dibutuhkan oleh mikroba aerobik untuk mengoksidasi bahan organik karbon dalam contoh uji air limbah. efluen atau air yang tercemar yang tidak mengandung atau yang telah dihilangkan zat-zat toksik dan zat-zat pengganggu lainnya. Pengujian dilakukan pada suhu  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 5 hari  $\pm 6$  jam. Adapun prosedur uji BOD adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan 2 buah botol DO, tandai masing-masing botol dengan notasi A1;A2
- b. Sebanyak 100 ml larutan disaring, kemudian diambil 75 ml lalu encerkan 100 x dan masukkan kedalam botol DO A1 dan A2; sampai meluap, kemudian tutup masing-masing botol secara hati-hati untuk menghindari terbentuknya gelembung udara

- c. Lakukan pengocokan 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 21<sup>st</sup> 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.

#### 3.5.4 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  $\text{O}_2$  untuk setiap 1000 mL contoh uji. Adapun prosedur pengujian COD adalah sebagai berikut :

- a. Sebanyak 2,5 ml volume contoh uji dipipet ke dalam tabung yang telah berisi larutan pencerna (1,5 ml) dan larutan pereaksi asam sulfat (3,5 ml), tabung ditutup dan dikocok perlahan sampai homogen
- b. Tabung diletakkan pada pemanas yang telah dipanaskan pada suhu  $150^{\circ}\text{C}$ , dilakukan refluks selama 2 jam

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

### 3.5.5 Analisa TSS

Analisa TSS (*Total Solid Suspension*) menggunakan metode gravimetri dimana metode tersebut digunakan untuk menentukan residu tersuspensi yang terdapat dalam sampel limbah cair. Analisa TSS dengan metode tersebut dijelaskan dalam SNI 06-6989.3-2004 yaitu sebagai berikut:

- Pertama lakukan penyaringan dengan peralatan vakum. Basahi saringan dengan sedikit air suling
- Aduk sampel limbah cair dengan pengaduk magnetic untuk memperoleh contoh uji yang lebih homogen
- Pipet sampel dengan volume tertentu, pada waktu contoh diaduk dengan pengaduk magnetik
- 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 limbah cair dengan padatan terlarut yang tinggi memerlukan pencucian tambahan.
- Pindahkan kertas saring secara perlahan dari peralatan penyaring dan pindahkan ke wadah timbang aluminium sebagai penyangga. Jika digunakan cawan *Gooch* pindahkan cawan dari rangkaian alatnya.
- Keringkan dalam oven setidaknya selama 1 jam pada suhu 103°C sampai dengan 105°C, dinginkan dalam desikator untuk menyeimbangkan suhu dan timbang.
- Ulangi tahapan pengeringan, pendinginan dalam desikator, dan lakukan penimbangan sampai diperoleh berat konstan atau sampai perubahan berat lebih kecil dari 4% terhadap penimbangan sebelumnya atau lebih kecil dari 0,5 mg.

Perhitungan TSS

$$TSS = \frac{(A - B)}{\text{Vol sampel (mL)}}$$

Keterangan

A = berat sampel setelah ditimbang

B = berat cawan tanpa sampel (mg)

C = berat cawan (mg)

### 3.5.6 Analisa Minyak dan Lemak

Dalam pengujian minyak dan lemak menggunakan metode gravimetric yaitu metode tersebut untuk menentukan minyak dan lemak dalam air limbah. Metode ini termasuk penanganan emulsi tertentu, zat yang tidak menguap, zat lain yang terekstraksi oleh pelarut dari contoh uji yang diasamkan seperti senyawa blerang, pewarna organik tertentu dan klorofil. Metode ini dapat digunakan untuk sampel uji yang mengandung minyak dan lemak lebih besar dari 10 mg/l. analisa minyak lemak dengan metode gravimetric menurut SNI 06-6989.10-2004 yaitu sebagai berikut:

- Pindahkan sampel yang akan diuji yaitu air limbah ke corong pisah. Tentukan volume sampel seluruhnya (tandai botol contoh uji pada meniscus air atau timbang berat contoh uji). Bilas botol sampel uji dengan 30 ml pelarut organik dan tambahkan pelarut pencuci ke dalam corong pisah.
- Kocok dengan kuat selama 2 menit. Biarkan lapisan memisah, keluarkan lapisan air.
- Keluarkan lapisan pelarut melalui corong yang telah dipasang kertas saring dan 10 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, yang keduanya telah dicuci dengan pelarut, ke dalam labu bersih yang telah ditimbang.
- Jika tidak dapat diperoleh lapisan pelarut yang jernih (tembus pandang), dan terdapat emulsi lebih dari 5 mL, lakukan sentrifugasi selama 5 menit pada putaran 2400 rpm. Pindahkan bahan yang disentrifugasi ke corong pisah dan keringkan lapisan pelarut melalui corong dengan kertas saring dan 10 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , yang keduanya telah dicuci sebelumnya, ke dalam labu bersih yang telah ditimbang.
- Gabungkan lapisan air dan emulsi sisa atau padatan dalam corong pisah. Ekstraksi 2 kali lagi dengan pelarut 30 mL tiap kalinya, sebelumnya cuci dahulu wadah contoh uji dengan tiap bagian pelarut.

- Ulangi langkah gabungkan lapisan air dan emulsi. Jika terdapat emulsi dalam tahap ekstraksi berikutnya
- Gabungkan ekstrak dalam labu destilasi yang telah ditimbang, termasuk cucian terakhir dari saringan dan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat dengan tambahan 10 mL sampai dengan 20 mL pelarut.
- Destilasi pelarut dalam penangas air pada suhu  $85^\circ\text{C}$ . Untuk memaksimalkan perolehan kembali pelarut lakukan destilasi
- Saat terlihat kondensasi pelarut berhenti, pindahkan labu dari penangas air. Dinginkan dalam desikator selama 30 menit pastikan labu kering dan timbang sampai diperoleh berat tetap.

### 3.5.7 Analisa Ammonia

Uji ammonia ini menggunakan metode fenat yaitu reaksi antara  $\text{NH}_3$  dan fenol dengan menggunakan katalis nitroprusida yang menghasilkan indofenol yang nantinya dapat dibaca dispektrofotometer dengan panjang gelombang 640 nm. Cara tersebut menggunakan prosedur berdasarkan SNI 06-6989.30-2005 yaitu :

- Masukkan sampel yang akan diuji dengan mengambilnya menggunakan pipet 25 ml kemudian masukkan dalam erlenmeyer 50 ml
- Tambahkan 1 ml larutan fenol, kemudian homogenkan
- Tambahkan 1 ml natrium nitroprusid, lalu homogenkan
- Tambahkan 2,5 ml larutan pengoksidasi, lalu homogenkan
- Tutup erlenmeyer tersebut dengan plastic atau paraffin film
- Biarkan selama 1 jam untuk pembentukan warna
- Kemudian masukkan kedalam kuvet pada alat spektrofotometer, lalu baca dan catat serapannya pada panjang gelombang 640 nm