3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

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* dan *Enterobacter gergoviae* 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 : n-Heksan; HCl; Natrium sulfat; Aquades jenuh oksigen; 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 Penelitian

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,

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

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 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, senrtifuge dan HPLC.

3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif kuantitatif, yaitu metode yang menitikberatkan pada fenomena atau masalah aktual berdasarkan fakta-fakta yang diselidiki oleh peneliti dengan interprestasi yang rasional dan akurat (Nawawi, 2003). Pelaksanaan memerlukan konsep dan variabel yang jelas dan pengukuran yang cermat. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu variabel kontrol, variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas diantaranya model kombinasi bakteri *Acinetobacter baumanni*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergoviae*. Sedangkan variabel bebas diantaranya kadar TSS, histamin, pH, amonia, lemak dan minyak.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pengambilan Sampel Limbah Cair

Limbah cair yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari PT Chamin Jaya Internasional Kecamatan Driyorejo, Kabupaten Gresik, Provinsi Jawa Timur. Sampel limbah cair langsung diambil dari saluran penampungan limbah yang kemudian dimasukkan dalam jurigen steril yang berukuran 30 liter. Mulut jurigen ditutup dengan lapisan plastik *wrap* untuk mencegah kontaminasi dari lingkungan, kemudian ditutup dengan tutup jurigen. Setelah itu jurigen yang berisi sampel

dimasukkan dalam *coolbox* yang di dalamnya berisi es dengan perbandingan es dan sampel 1:1, hal ini bertujuan 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. Pembiakan Bakteri

Pembiakan bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada proses pembiakan bakteri pertama-tama dilakukan sterilisasi alat. Menurut Darwis (2006), sterilisasi merupakan suatu proses untuk menghilangkan atau menginaktivasikan mikroorganisme hidup (bakteri, jamur, virus dan organisme bersel satu lainnya) yang terdapat pada suatu produk. Strerilisasi menggunakan uap panas dilakukan pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Autoklaf bekerja dengan sistem sterilisai basah pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Pada penelitian ini alat-alat yang perlu dilakukan sterilisasi antara lain : cawan petri, tabung reaksi, dan pipet volume. Tujuan dilakukannya strerilisasi pada alat tersebut adalah untuk menghindari kontaminasi silang oleh mikroorganisme selama proses pembiakan bakteri.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan reisolasi dari stok kultur *Acinetobacter baumanni, Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergoviae,* tujuannya adalah untuk memastikan ada atau tidaknya kontaminasi sehingga didapatkan koloni murni. Metode yang digunakan untuk reisolasi ini adalah metode striking kuadran, kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian dilakukan pewarnaan gram secara mikroskopis untuk melihat gambaran sel apakah terdapat cemaran atau tidak. Setelah dipastikan bahwa koloni yang tumbuh adalah biakan

murni, dari kuadran IV diambil satu sampai dua koloni dengan menggunakan jarum osse dan dimasukkan ke dalam medium cair TSB yang terdapat dalam tabung reaksi dengan volume 10 mL. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Indikator tumbuhnya koloni bakteri pada media cair TSB adalah pada media yang digunakan untuk pembiakan bakteri akan berwarna keruh jika dibandingkan dengan media cair TSB yang kosong. Selanjutnya dilakukan pewarnaan gram untuk memastikan ada atau tidaknya cemaran pada koloni yang dibiakkan. Tahapan pewarnaan gram yaitu pertama dilakukan pembuatan preparat untuk pewarnaan, diambil gelas objek steril dan panaskan diatas nyala api spirtus untuk membebaskannya dari lemak, lalu ambil satu koloni bakteri dengan jarum ose steril dan ratakan pada gelas objek tersebut, kemudian keringkan diatas nyala api spirtus sambil digoyangkan hingga kering. Selanjutnya dilakukan tahap pewarnaan, pada preparat yang telah kering ditetesi dengan kristal violet ; alkohol 96% ; dan amonium oksalat, didiamkan selama satu menit lalu buang larutan pewarna tersebut kemudian tetesi dengan iodium ; kaliumiodida ; dan akuadest diamkan selama satu menit, buang larutan tersebut dan dicuci. Setelah itu preparat ditetesi dengan aceton 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 yaitu amati preparat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 objek. Jika hasil yang didapatkan tidak terdapat kontaminasi atau cemaran maka didapatkan koloni murni, lalu dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm untuk mendapatkan nilai OD 0,1 atau 10^8. Setelah didapatkan nilai OD, dihitung V_1 atau volume biakan yang dibutuhkan dengan menggunakan rumus :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$0{,}642 \times V_1 = 0{,}1 \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1{,}56 \text{ mL}$$

Setelah didapatkan V_1 = 1,56 mL kemudian dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril dengan volume 8,44 mL yang berada pada tabung reaksi sehingga didapatkan koloni bakteri dengan kepadatan 10^8.

3.3.3. Pengenceran Bakteri

Proses pengenceran bakteri bertujuan untuk mengurangi kepadatan mikroba yang akan ditanam (Ferdiaz, 1993). Ditambahkan oleh Dwijosaputro (1989), tujuan pengenceran adalah untuk mendapatkan satu koloni murni dan selanjutnya koloni yang didapat akan dijadikan piaraan murni. Pengenceran dilakukan dari kepadatan 10^8 diencerkan menjadi kepadatan 10^6. Tahap pertama sebelum dilakukan proses pengenceran yaitu dihitung volume biakan murni bakteri yang dibutuhkan dengan menggunakan rumus :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$10^8 \times V_1 = 10^6 \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0{,}1 \text{ mL}$$

Dari hasil perhitungan tersebut diketahui jumlah volume biakan bakteri dengan kepadatan 10^8 yang dibutuhkan untuk pengenceran menjadi kepadatan 10^6 adalah 0,1 mL sehingga volume larutan NaCl steril yang dibutuhkan adalah sebanyak 9,9 mL. Pada penelitian ini digunakan tiga jenis bakteri yaitu *Acinetobacter baumanni, Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergoviae* sehingga disiapkan tiga buah tabung reaksi untuk masing-masing pengenceran dengan larutan NaCl sebanyak 9,9 mL tiap tabung rekasi. Kemudian ditambahkan 0,1 mL biakan bakteri ke dalam tabung reaksi masing-masing satu spesies.

3.3.4. Pemasangan Aerator dan Penambahan Bakteri

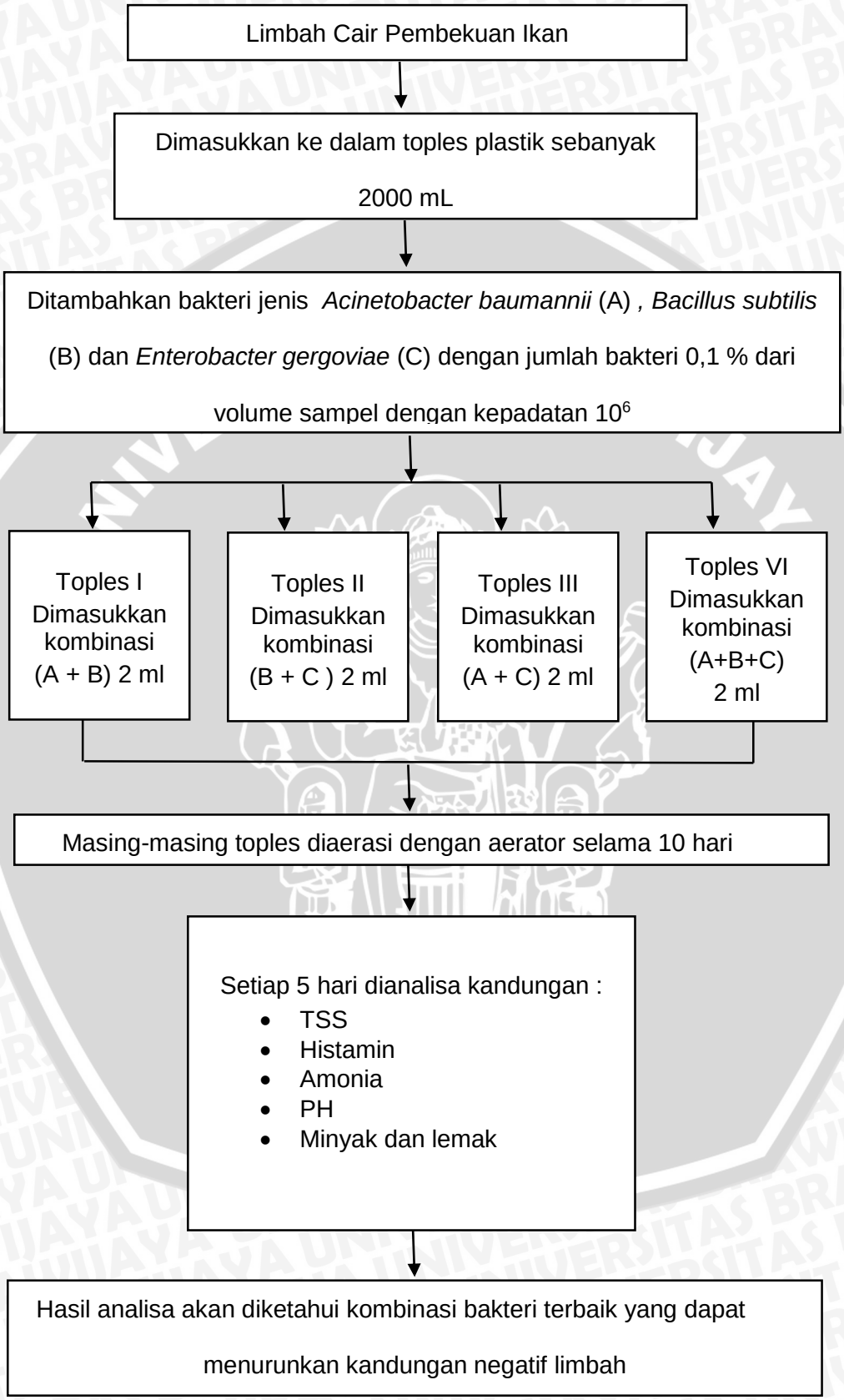
Pemasangan aerator pada penelitian ini bertujuan untuk memberikan *supply* oksigen (O_2) ke dalam limbah cair yang kemudian akan digunakan oleh bakteri aerob yang ditambahkan ke dalamnya untuk proses metabolisme atau proses pertumbuhannya. Adapun tahapan pemasangan aerator adalah sebagai berikut:

- 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* dan *Enterobacter gergoviae* dalam limbah cair adalah sebagai berikut:

- Setelah melakukan pembiakan bakteri *Acinetobacter baumannii, Bacillus subtilis* dan *Enterobacter gergoviae* dalam media cair TSB, bakteri tersebut dimasukkan ke dalam limbah cair sesuai dengan *treatment*nya
- 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.

3.4. Skema Kerja Penelitian



repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.5. Analisa Beberapa Parameter

3.5.1. Analisa TSS (*Total Suspended Solid*)

Prosedur uji padatan tersuspensi total (*Total Suspended Solid*/TSS) secara gravimetri berdasarkan SNI 06-6989.3-2004. Prinsip kerja uji TSS adalah contoh uji yang telah homogen disaring dengan kertas yang telah ditimbang. Residu yang tertahan pada saringan dikeringkan sampai mencapai berat konstan pada suhu 103°C sampai dengan 105°C. Adapun prosedur pengujian TSS adalah sebagai berikut :

a. Lakukan penyaringan dengan peralatan vakum. Basahi dengan sedikit air suling
b. Aduk contoh uji dengan pengaduk magnetik untuk memperoleh contoh uji yang lebih homogen
c. Pipet contoh uji dengan volume tertentu, pada waktu contoh 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
e. Pindahkan kertas saring secara hati-hati dari peralatan penyaring dan pindahkan ke wadah timbang alumunium sebagai penyangga
f. Keringkan dalam oven setidaknya selama 1 jam pada suhu 103°C sampai dengan 105°C, dinginkan dalam desikator untuk menyeimbangkan suhu dan timbang
g. 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

3.5.2. Analisa pH

Prosedur pengujian derajat keasaman (pH) dengan menggunakan alat pH meter berdasarkan SNI 06-6989.11-2004. Prinsip metode pengukuran pH berdasarkan pengukuran aktifitas ion hidrogen secara potensial/elektrometri dengan menggunakan pH meter. Adapun prosedur pengujian pH adalah sebagai berikut :

a. Keringkan dengan kertas tisu selanjutnya bilas elektroda dengan air suling
b. Bilas elektroda dengan contoh uji
c. Celupkan elektroda ke dalam contoh uji sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap
d. Catat hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter

3.5.3. Analisa Minyak dan Lemak

Prosedur pengujian minyak dan lemak berdasarkan SNI 06-6989.10-2004 secara gravimetri untuk air dan air limbah. Prinsip uji minyak dan lemak dalam contoh uji air diekstraksi dengan pelarut organik dalam corong pisah dan untuk menghilangkan air yang masih tersisa digunakan Na_2SO_4 anhidrat. Ekstrak minyak dan lemak dipisahkan dari pelarut organik secara destilasi. Residu yang tertinggal pada labu destilasi ditimbang sebagai minyak dan lemak. Adapun prosedur pengujian minyak dan lemak adalah sebagai berikut:

a. Pindahkan contoh uji ke corong pisah. Tentukan volume contoh uji seluruhnya. Bilas botol contoh uji dengan 30 mL pelarut organik dan tambahkan pelarut pencuci ke dalam corong pisah
b. Kocok dengan kuat selama 2 menit. Biarkan lapisan memisah, keluarkan lapisan air

c. Keluarkan 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

d. Jika tidak dapat diperoleh lapisan pelarut yang jernih (tembus pandang), dan terdapat emulsi lebih dari 5 mL, lakukan sentrifugasi ke corong pisah dan keringkan lappisan pelarut melalui corong dengan kertas saring dan 10 g Na_2SO_4 yang keduanya telah dicuci sebelumnya, ke dalam labu bersih yang telah ditimbang

e. 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

f. Ulangi langkah pada butir e) jika terdapat emulsi dengan tambahan 10 mL sampai dengan 20 mL pelarut

g. Gabungkan 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

h. Destilasi pelarut dalam penangas air pada suhu 85°C. Untuk memaksimalkan perolehan kembali pelarut lakukan destilasi

i. 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

3.5.4. Analisa Amonia

Prosedur pengujian kadar amonia dengan spektrofotometer secara fenat berdasarkan SNI 06-6989.30-2005. Prinsip pengujian amonia bereaksi hipoklorit dan fenol yang dikatalisis oleh natrium nitroprusida membentuk senyawa biru indofenol. Adapun prosedur pengujian kadar amonia adalah sebagai berikut :

a. Pipet 25 ml contoh uji masukkan ke dalam erlenmeyer 50 mL
b. Tambahkan 1 mL larutan fenol, dihomogenkan
c. Tambahkan 1 mL natrium nitroprusid, dihomogenkan
d. Tambahkan 2,5 mL larutan pengoksidasi, dihomogenkan
e. Tutup erlenmeyer tersebut dengan plastik atau parafin film
f. Biarkan selama 1 jam untuk menbentuk warna
g. Masukkan ke dalam kuvet pada alat spektrofotometer, baca dan catat serapannya pada panjang gelombang 640 nm

3.5.5. Analisa Histamin

Prosedur pengujian histamin berdasarkan SNI 01-2360-1991. Prinsip pengujian kadar histamin adalah zat histamin dalam contoh dikonversikan ke dalam bentuk -OH, kemudian diisolasi dengan resin penukar ion dan diubah ke bentuk derivatnya dengan ortoptalatdikarboksilaldehide (OPT) dan diukur secara fluorometris. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam ekivalen histamin levels. Adapun prosedur pengujian kadar histamin adalah sebagai berikut:

a. Tahap ekstraksi

   Sepuluh gram sampel ditimbang lalu ditambahkan dengan methanol sebanyak 50 ml kemudian dihomogenkan dengan menggunakan homogenizer (blender) kurang lebih selama 1-2 menit. Setelah homogen maka sampel tersebut dipanaskan dalam water bath pada suhu 60 ^{o}C selama

15 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya setelah dingin, sampel tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan methanol sampai tanda tera lalu dikocok agar homogen. Setelah itu, larutan sampel disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.

b. Tahap clean up atau tahap elusi

Pertama-tama disiapkan kolom kromatografi (panjang 20 cm dan diameter 7 mm) kemudian ke dalam kolom tersebut dimasukkan glass wool secukupnya (tingginya 1 cm). Selanjutnya masukkan resin penukar ion (dowex 1-x800-100-mesh) ke dalam kolom sampai tingginya kurang lebih 8 cm (diusahakan resin tidak sampai kering dengan cara dibilas dengan aquades karena akan mempengaruhi daya kerja penukar ion tersebut). Selanjutnya sampel dilewatkan ke dalam kolom sebanyak 1 ml dan ditampung hasilnya dalam labu ukur 50 ml yang telah diberi 5 ml HCl 1 N.

c. Tahap pembentukan

Ke dalam masing-masing tabung reaksi dipipet sebanyak 10 ml HCl 0,1 N kemudian ditambahkan 5 ml sampel (hasil 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 lalu dihomogenkan dan dibiarkan selama 5 menit. Kemudian ditambahkan lagi ortoptalatdikarboksilaldehide (OPT) 1% sebanyak 1 ml lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 4 menit. Selanjutnya ditambahkan 3 ml H_3PO_4 3,57 N lalu dihomogenkan. Setelah selesai, sampel siap untuk dibaca menggunakan spektrofluorometer pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan panjang gelombang emisi 444 nm.