

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif kualitatif. Dalam penelitian ini dibandingkan beberapa parameter polutan dalam limbah cair tapioka yang diberi dan tanpa perlakuan *Scenedesmus* sp. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan dengan pemberian isolat yang sama yaitu 100ml. Beberapa parameter polutan dalam limbah cair tapioka yang diukur meliputi: BOD, COD, pH, NO₃, NO₂, dan NH₄. Untuk mengetahui survivabilitas *Scenedesmus* sp. dalam limbah cair tapioka dilakukan dengan membuat kurva pertumbuhannya.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2012 di Laboratorium Ekologi dan Laboratorium Optik, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan bahan

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer 1000 ml, beaker glass 1000 ml, tabung reaksi, aquarium, autoclave, bunsen, inkubator, enkas, sentrifugase, oven, mikropipet, mikroskop stereo, pipet tetes, lampu TL 36 Watt, dan hemacytometer.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah mikrolaga *Scenedesmus* sp, aquades, alkohol 70%, limbah cair tapioka, dan medium ekstrak tauge (MET).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan atau meminimalkan keberadaan mikroorganisme atau zat pengganggu pada alat dan media kultivasi yang akan digunakan selama penelitian. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara alat dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air tawar sampai bersih, kemudian disemprot dengan alkohol 96%, dan dibiarkan kering di udara. Wadah kultur (erlenmeyer) setelah kering ditutup dan disumbat dengan kapas steril atau ditutup rapat dengan aluminium foil.

Sterilisasi bahan (media kultur) dilakukan secara bertahap (tyndalisasi) dengan dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 1 jam, dilakukan tiga kali berturut-turut dengan selang waktu 24 jam.

3.4.2 Persiapan Medium Limbah Cair Tapioka (MLCT)

Air limbah yang digunakan sebagai medium *Scenedesmus* sp. dalam penelitian ini adalah air limbah yang belum mengalami pengolahan yang diambil dari PT Naga Mas Sakti, Desa Slorok, Kecamatan Kromengan. Limbah cair yang digunakan diambil 1 bulan setelah produksi.

Pada penelitian ini konsentrasi medium yang digunakan yaitu 100% limbah cair tapioka dan air untuk kontrol. Proses pembuatan medium limbah cair tapioka ini diawali dari pengambilan limbah tepung tapioka sebanyak 2000 ml, kemudian dituangkan kedalam aquarium. Sedangkan untuk kontrol hanya menggunakan aquades sebanyak 2000 ml.

3.4.3 Subkultur *Scenedesmus* sp. Pada Media MET (Media Ekstrak Tauge)

Tujuan dari subkultur adalah untuk memperbanyak isolat yang akan digunakan sebagai inokulum dalam limbah cair tapioka. Prosedur kerja yang dilakukan untuk pemurnian kultur *Scenedesmus* yaitu dengan metode pengenceran. Sebanyak 1 ml biakan *Scenedesmus* dari kultur koleksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml MET (Medium Ekstrak Tauge) kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dari kultur tersebut diambil 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua. Proses tersebut dilakukan hingga tabung reaksi keempat. Kultur selanjutnya diletakkan di rak kultur dan diinkubasi selama 30 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Kultur *Scenedesmus* yang tumbuh dengan baik dan murni (tanpa kontaminan) diperbanyak lagi secara bertahap hingga didapatkan 100 ml kultur murni *Scenedesmus*. Sebelum digunakan sebagai inokulum, biakan kultur persediaan diremajakan pada media perlakuan. Selanjutnya biakan kultur diletakkan di rak kultur dan diinkubasi dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Sel yang telah berada dalam tahap pertumbuhan yang seragam digunakan sebagai inokulum (Prihantini, 2007).

3.4.4 Penginokulasian Sel *Scenedesmus* sp. pada Limbah Cair Tapioka

Sel yang diperoleh dari subkultur diambil sebanyak 100 ml, dimana setiap ml mengandung 50.000 sel/ml kemudian dikultivasi kedalam limbah cair tapioka dan aquades. Aquarium yang berisi *Scenedesmus* sp. diletakkan di rak kultur dan diberi pencahayaan dari 4 buah lampu TL masing-masing berkekuatan 36 watt. Lampu diletakkan sejajar di samping kiri dan kanan rak kultur dengan jarak kurang lebih 10 cm dari erlenmeyer kultur dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap.

3.4.5 Perlakuan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan perlakuan berupa pemberian isolat *Scenedesmus* sp yang sama yaitu 100 ml. Sebelum perlakuan dilakukan, diukur terlebih dahulu kandungan pada limbah cair tapioka sebelum kultivasi. Penelitian ini menggunakan 2 kontrol yaitu limbah cair tapioka tanpa aplikasi *Scenedesmus* sp dan Aquades untuk mengetahui pertumbuhannya. Setiap akuarium diberi sel *Scenedesmus* sp dalam jumlah yang sama. Sesudah diberi *Scenedesmus* sp, pada akuarium yang berisi limbah cair tapioka tersebut akan diukur parameter yang berupa pH, COD, BOD, Amonia (NH_3), Nitrat (NO_3), dan Nitrit (NO_2). Untuk mengetahui kelimpahan populasi sel dari setiap perlakuan dilakukan pengamatan setiap hari.

3.5 Pengamatan Penelitian

Parameter yang diamati selama penelitian yaitu

1. Kandungan BOD, COD, Ammonia, Nitrit, Nitrat, dan pH.

2. Kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. (sel/ml) setiap hari selama 10 hari pada penelitian utama.

3.6 Perhitungan Kelimpahan Sel *Scenedesmus* sp.

Penghitungan kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. pada setiap tahap penelitian dilakukan dengan menggunakan *Haemocytometer Neubauer Improved* (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Estimasi kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. menggunakan rumus kelimpahan sel menurut Punchard (2006) dan Taw (1990):

$$D = \left\{ \frac{N_1 + N_2}{2} \times \frac{(25 \times 10^4)}{n} \right\} \times DF$$

Keterangan:

D : Jumlah Sel

N1 : Jumlah mikroalga pada bidang atas *Haemocytometer*

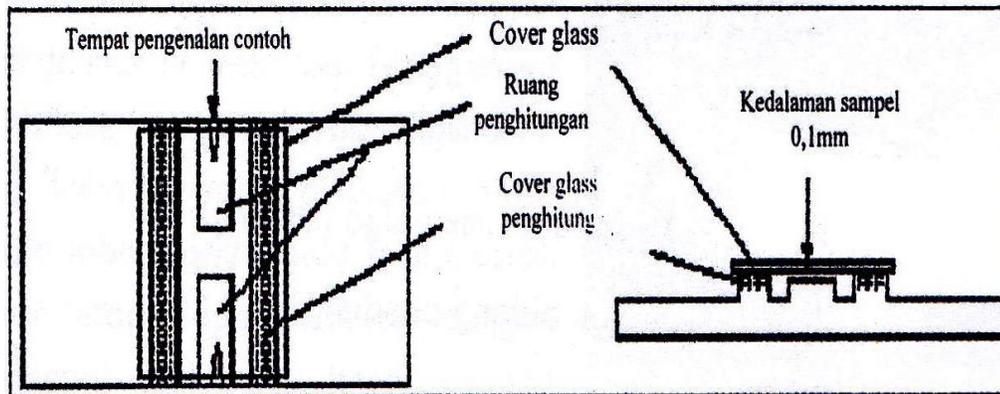
N2 : Jumlah mikroalga pada bidang bawah *Haemocytometer*

N : Jumlah kotak yang diamati

25×10^4 : Konstanta *Haemocytometer* Neubauer

DF : Faktor Dilusi (Volume total/volume inokulan)

Penampang *haemocytometer* disajikan pada Gambar 3. Hasil penghitungan kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. per hari kemudian diplotkan untuk membuat kurva pertumbuhan sel dengan sumbu X menunjukkan hari kultivasi dan sumbu Y sebagai kelimpahan sel *Scenedesmus* sp.



Gambar 3.1. Haemacytometer (Kawaroe, 2010)

3.7 Metode Analisis Sampel

Analisis sampel contoh dilakukan di laboratorium Biologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Malang. Analisis sampel meliputi BOD, COD, NH_3 , NO_2 , dan NO_3 . Analisis sampel dilakukan guna mengetahui kadar kandungan kimia dalam limbah setelah dilakukan kultivasi dan dibandingkan dengan baku mutu limbah cair tapioka .

a. COD (*Chemical Oxygen Demand*) (APHA, 1976)

Kebutuhan oksigen kimiawi ditentukan dengan metode titrimetrik. Pereaksi yang digunakan adalah $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.25 N, H_2SO_4 pekat, larutan ferro ammonium sulfat ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) 0.0025 N dan indicator feroin.

Sebanyak 10ml sampel dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml kemudian ditambahkan 5 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dan 15 ml H_2SO_4 pekat kemudian dinginkan. Kemudian tambahkan 7.5 ml aquades kemudian beri 2-3 tetes indicator feroin . campuran

dititrasi dengan larutan FAS atau feroin ammonium sulfat. Titrasi dihentikan bila terjadi perubahan dari biru kehijauan menjadi coklat kemerahan. Volume titran yang digunakan dicatat (a ml). prosedur yang sama juga dilakukan terhadap blanko dan volume titran dicatat (b ml).

b. Kadar Nitrat (N-NO₃) (APHA, 1976)

Kadar nitrat ditentukan berdasarkan metode brucine dengan menggunakan pereaksi brucine (0.05 gr asam sulfanilat, 0.5 gr brucine sulfat dan 1.5 ml H₂SO₄ pekat dilarutkan dalam 50 ml air destilata), larutan NaCl 30% (30 gr NaCl dalam 100 ml air destilata) dan larutkan H₂SO₄ 75%. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer.

Sampel sebanyak 25 ml dimasukkan kedalam Erlenmeyer 50 ml kemudian ditambahkan 2 ml NaCl 30%, 10 ml H₂SO₄ pekat dan 0.5 ml pereaksi brucin. Campuran kemudian dipanaskan pada suhu 95 °C selama 20 menit. Setelah itu sampel dianalisa menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 410 nm. Bila terdapat nitrat maka akan terbentuk warna kuning muda yang intensitasnya sebanding dengan kadar nitrat. Kadar nitrat ditentukan berdasarkan kurva standar.

c. Kadar Amonia Bebas (N-NH₃) (APHA, 1976)

Penentuan kadar ammonia dilakukan berdasarkan metode Nesslerisasi dengan menggunakan alat spektrofotometer. Bahan kimia yang digunakan adalah pereaksi Reagen Nessler (5 gr HgI₂, 8 gr NaOH dan 10 gr KI dilarutkan dalam 50 ml air destilata).

Sampel sebanyak 25 ml dimasukkan dalam Erlenmeyer 50 ml kemudian diberi 1 ml larutan Reagen Nessler dan didiamkan selama 20 menit. Reaksi yang terjadi akan membentuk warna kuning yang intensitasnya tergantung kadar amonia yang dikandungnya. Kemudian sampel dianalisa menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 400 nm. Kadar ammonia ditentukan berdasarkan kurva standar.

d. Nitrit (metode spektrofotometri)

Prinsip pengukuran kadar nitrit adalah berdasarkan pembentukan warna kemerah-merahan yang terjadi bila mereaksikan nitrit dengan asam sulfanilat dan N-(1 – naftil etilen diamin dihidroklorida) pada pH 2,0 sampai 5.

Ditetapkan kadar larutan baku nitrit. Dibuat larutan standar baku nitrit ($\text{NO}_2\text{-N}$). Pipet larutan induk nitrit yang telah ditetapkan kadarnya ke dalam labu ukur 100 ml untuk memperoleh kadar nitrit sebesar 0,05; 0,10; 0,25; dan 0,50 mg/l. ditambahkan air suling bebas nitrit sampai tepat pada tanda tera. Pipet 50 ml contoh ke dalam labu Erlenmayer 100 ml. Ke dalam larutan standar dan contoh ditambahkan 1ml asam sulfanilat. Biarkan larutan tersebut bereaksi 2-8 menit. Ditambahkan 1 ml larutan naftil etilendiamen dihidroklorida, diaduk dan dibiarkan paling sedikit 10 menit, tetapi tidak lebih dari 2 jam. Dimasukkan ke dalam kuvet spektrofotometer dan absorbennya.

3.8 Analisis Data

Data hasil pengamatan atau pengukuran parameter polutan limbah cair tapioka baik yang diaplikasi dengan atau tanpa *Scenedesmus* sp disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Hasil yang didapat digunakan untuk mengetahui kandungan limbah cair tapioka, dan dibandingkan dengan baku mutu limbah cair. Adapun pertumbuhan *Scenedesmus* sp yang dikultivasi pada limbah cair tapioka dan aquades disajikan dalam bentuk kurva atau grafik pertumbuhan.

