

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental. Pengambilan data penelitian diperoleh dari perhitungan kepadatan sel dan uji kadar lipid *Scenedesmus* sp. tiap perlakuan. Data dianalisa menggunakan metode statistik Rancangan Acak Lengkap (RAL) *One Way ANOVA*, dimana faktor yang diujikan adalah pengaruh perbedaan suhu (15°C, 20°C, 25°C, dan 30°C) terhadap kelimpahan sel dan kadar lipid *Scenedesmus* sp. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali ulangan.

#### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Juli 2012 bertempat di Laboratorium Ekologi dan Sumber Daya Alam Hayati serta Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.3 Alat dan bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer 1.000 ml, beaker glass 250 ml, cawan petri, tabung reaksi 100 ml, gelas ukur 100 ml, pengaduk kaca, lemari es, timbangan elektrik, mikroskop kamera, pH-meter, termometer, hemasitometer, lux meter, timer, lampu TL (*Tube Luminescent*)

berkekuatan 36 watt, spatula, enkas, autoklaf, bunsen, jarum ose, pipet tetes, aerator dan inkubator.

Bahan yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah mikroalga *Scenedesmus* sp. Medium Limbah Cair Tapioka (MLCT) sebagai medium alternatif dalam kultivasi mikroalga *Scenedesmus* sp., Medium Ekstrak Tauge (MET) medium alternatif yang digunakan untuk kultur mikroalga, kertas tissue, kapas steril, aluminium foil, kertas label, akuades dan alkohol 96%.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Sterilisasi Alat**

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 plastik tahan panas yang diikat dengan karet. Skema kerja penelitian dapat dilihat pada lampiran 3.

#### **3.4.2 Sterilisasi Bahan**

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 plastik tahan panas yang diikat dengan karet. Skema kerja penelitian dapat dilihat pada lampiran 3.

### 3.4.3 Pembuatan Medium Limbah Cair Tapioka (MLCT)

Air limbah yang digunakan sebagai medium *Scenedesmus* sp. dalam penelitian ini adalah berasal dari pengendapan tepung tapioka PT. PT Nagamas Sakti yang beralamat di Dsa Slorok Kec. Kromengan Kabupaten Malang.

Medium yang digunakan untuk kultivasi *Scenedesmus* sp. terbuat dari limbah cair tapioka dengan konsentrasi 50%, berdasarkan hasil penelitian pendahuluan dari konsentrasi 25%, 50% dan 75%. Limbah cair tapioka yang memiliki konsentrasi 50% dapat memacu pertumbuhan lebih baik dari pada konsentrasi 25% dan 75%.

Proses pembuatan medium limbah cair tapioka diawali dari pengambilan limbah pengendapan tepung tapioka sebanyak 1.000 ml, disaring dengan menggunakan kapas yang dibungkus dengan kain kasa, kemudian dituangkan kedalam *Beaker gelas* ukuran 2.000 ml, dicampur dengan aquades sebanyak 1.000 ml, kemudian kedua larutan tersebut dihomogenkan dengan cara mengaduk perlahan hingga kedua larutan tersebut dapat tercampur. Selanjutnya medium limbah cair tapioka 2.000 ml, dituangkan kedalam 12 erlenmeyer yang masing-masing erlemeyer berisi 200 ml medium limbah cair tapioka. Skema kerja pembuatan medium limbah cair tapioka selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.1.

### 3.4.4 Kultur *Scenedesmus* sp.

Isolat murni *Scenedesmus* sp. yang akan dikulturkan diperoleh dari Laboratorium Produktivitas dan Lingkungan Perairan (ProLing) Institut Pertanian Bogor. Wadah kultur yang digunakan adalah Erlenmeyer ukuran 1000 ml sebanyak

12 buah, yang ditempatkan pada suhu ruang, dan ditempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan aerasi dan lampu TL berkekuatan 36 watt sebanyak 4 buah, yang diatur sedemikian rupa agar setiap perlakuan mendapatkan intensitas cahaya sesuai dengan tingkat perlakuan.

Prosedur kerja yang selanjutnya dilakukan pemurnian kultur *Scenedesmus* dengan metode pengenceran. Sebanyak 1 ml biakan *Scenedesmus* sp. 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* sp. 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). Skema kerja peremajaan mikroalga *Scenedesmus* sp. dapat dilihat pada lampiran 3.3.

#### **3.4.5 Penginokulasian Sel *Scenedesmus* sp.**

Penginokulasian sel *Scenedesmus* dilakukan dengan cara sebagai berikut: isolat murni *Scenedesmus* sp. yang diinokulasikan sebesar 10 ml per perlakuan yang disentrifius dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit, endapan sel dari

hasil sentrifugasi kemudian diinokulasikan ke dalam medium. Skema kerja penginokulasian *Scenedesmus* sp. selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.4.

Erlenmeyer yang berisi *Scenedesmus* sp. untuk kultur perlakuan diletakkan di rak kultur dan diberi pencahayaan dari 4 buah lampu TL masing-masing berkekuatan 36 watt. Lampu diletakkan dibawah rak kaca dengan jarak masing-masing perlakuan telah ditentukan dari erlenmeyer kultur. Fotoperiodisitas yang digunakan 14 jam terang dan 10 jam gelap. Penghitungan jumlah sel untuk mendapatkan data kepadatan sel dilakukan setiap 24 jam sekali mulai  $t_0$  (hari ke-0) hingga  $t_{10}$  (hari ke-10).

Sebanyak 1 ml kultur diambil secara aseptik dari tiap-tiap erlenmeyer kultur menggunakan mikro pipet dan diletakkan ke dalam botol sampel. Selanjutnya, kultur diletakkan ke dalam kamar hitung *Improved Neubauer*. Sel dihitung dengan bantuan mikroskop. Sel *Scenedesmus* sp. yang dihitung adalah seluruh sel yang hidup, berwarna hijau, baik dalam bentuk uniseluler maupun koloni.

#### **3.4.6 Perlakuan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan setiap kali perlakuan terdiri dari 3 kali ulangan, perlakuan berupa pemberian suhu yang berbeda disetiap perlakuan, yaitu 15°C diletakkan pada kulkas, 20°C diletakkan pada suhu oven, 25°C pada suhu ruangan dan 30°C pada suhu even. Untuk mengetahui kepadatan populasi sel dari setiap perlakuan dilakukan pengamatan setiap hari, dari hari ke-0 sampai hari ke-10 ( $H_0$ - $H_{10}$ ). Dari hasil yang diperoleh diharapkan dapat diketahui

kepadatan sel *Scenedesmus* sp. tertinggi. Skema kerja perlakuan penelitian dapat dilihat pada lampiran 3.5.

Pengamatan penelitian dilakukan dengan bantuan mikroskop dan hemasitometer. Sebanyak 1 ml kultur diambil dari erlenmeyer dengan mikropipet dan dilakukan pengenceran  $10^1$  dengan cara dimasukkan kultur kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades kemudian dihomogenkan dan diambil sebanyak 0.5 ml setelah itu diletakkan kedalam kamar hitung hemasitometer. Sel yang dihitung adalah seluruh sel yang hidup, berwarna hijau, baik dalam bentuk uniseluler atau koloni.

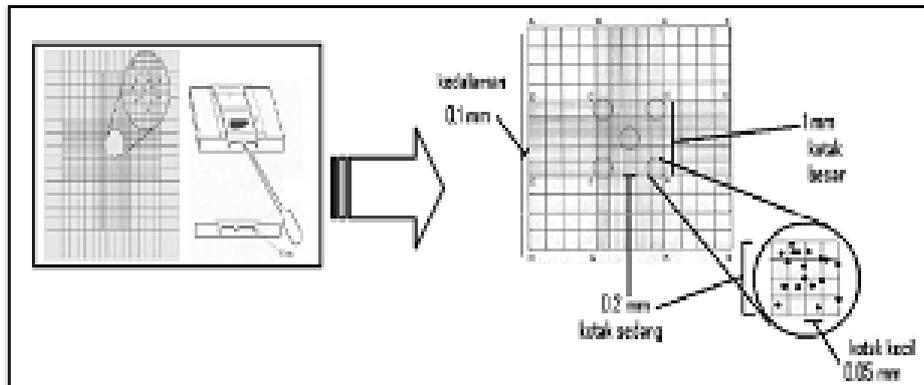
#### **3.4.7 Pengamatan Penelitian**

Parameter yang diamati selama penelitian meliputi:

1. Parameter yang pertama meliputi perhitungan kepadatan sel *Scenedesmus* sp. (sel/ml) pada berbagai suhu yang berbeda, yaitu 15°C, 20°C, 25°C dan 30°C yang diamati setiap hari mulai  $t_0$  (hari ke-0) hingga  $t_{10}$  (hari ke-10).
2. Parameter yang kedua meliputi pengaruh pemberian suhu yang berbeda, yaitu 15°C, 20°C, 25°C dan 30°C terhadap kandungan lipid yang dihasilkan oleh mikroalga *Scenedesmus* sp. yang dibudidayakan pada limbah cair tapioka.

#### **3.4.8 Perhitungan Kelimpahan Sel *Scenedesmus* sp.**

Penghitungan kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. pada setiap tahap penelitian dilakukan dengan menggunakan *Haemocytometer Neubauer Improved* (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).



Gambar 3.1. Skema *Haemocytometer neubauer improved* (Isnansetyo, 2011)

Hasil perhitungan kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. perhari kemudian diplotkan untuk membuat kurva pertumbuhan sel dengan sumbu X, menunjukkan hari kultivasi dan sumbu Y, sebagai kelimpahan sel *Scenedesmus* sp.

Penghitungan dengan *haemocytometer* beserta perhitungannya dapat dilihat pada Lampiran 1. Estimasi kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. menggunakan rumus kelimpahan sel menurut Punchard (2006):

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

Keterangan:

D : Jumlah Sel

N1 : Jumlah mikroalga pada bidang atas *Haemocytometer*

N2 : Jumlah mikroalga pada bidang bawah *Haemocytometer*

N : Jumlah kotak yang diamati

25 x 10<sup>4</sup> = Konstanta *Haemocytometer* Neubauer

DF : Faktor Dilusi (Volume total/volume inokulan)

Pada penelitian ini dilakukan pengenceran sebanyak 1 kali yaitu ( $10^1$ ). Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil biakan *Scenedesmus* sp. sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades. Campuran tersebut diperoleh pengenceran 1 kali ( $10^1$ ), kemudian dihitung jumlah sel mikroalga dari hasil pengenceran I sebanyak 0.5 ml dengan menggunakan mikroskop (Prihantini, 2007).

#### **3.4.9 Pemanenan Biomassa Mikroalga**

Pemanenan mikroalga dilakukan pada akhir fase eksponensial. Pemanenan dilakukan dengan metode penyaringan (filtrasi). Mikroalga dipanen dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring yang telah diketahui beratnya. Berat basah panen mikroalga didapat dari mengurangi berat basah kertas saring dan mikroalga dengan berat kering kertas saring. Pengeringan (*drying*) mikroalga dilakukan dengan cara dikeringkan kertas saring dan hasil panen ke dalam oven bersuhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam kemudian ditimbang. Berat kering panen mikroalga didapat dari mengurangi berat kering kertas saring dan mikroalga dengan berat kering kertas saring (Pangabea, 2010). Skema kerja pemanenan biomassa mikroalga selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.6.

#### **3.5 Analisis Kandungan Lipid**

Sampel mikroalga sebesar 200 mg (W1) dimasukkan ke dalam kertas saring, pada kedua ujung bungkus ditutup dengan kapas bebas lemak dan selanjutnya dimasukkan ke dalam selongsong lemak, kemudian sampel yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam labu lemak yang sudah ditimbang berat tetapnya

(W2) dan disambungkan dengan tabung *Soxhlet*. Selongsong lemak dimasukkan ke dalam ruang ekstraktor tabung *Soxhlet* dan disiram dengan pelarut lemak (n-heksana p.a). Kemudian dilakukan *refluks* selama 6 jam. Pelarut lemak yang ada dalam labu lemak dimasukkan ke mesin rotari evaporator hingga semua pelarut lemak menguap. Pelarut dikeluarkan sehingga tidak kembali ke dalam labu lemak, selanjutnya labu lemak dialiri gas N<sub>2</sub>, setelah itu labu didinginkan dalam desikator sampai beratnya konstan (W3). Skema kerja analisa kadar lemak dengan metode *Soxhlet* selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.7. Perhitungan kadar lemak adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ kadar lemak} = \frac{W3 - W2}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W1 : berat sampel (g)

W2 : berat labu lemak kosong (g)

W3 : berat labu lemak dengan lemak (g)

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan disajikan dalam bentuk table dan grafik, metode yang digunakan untuk menganalisis data dari hasil perhitungan kelimpahan sel *Scenedesmus* sp. adalah secara deskriptif. Perhitungan jumlah populasi dilakukan setiap hari, dari hari perhitungan awal sampai hari ke-10 (H<sub>0</sub>-H<sub>10</sub>). Hasil yang didapat digunakan untuk mengetahui jumlah ppopulasi maksimum yang dapat dicapai. Hasil setiap perlakuan tersebut dibandingkan, sehingga akan diketahui perlakuan terbaik yang dapat memberikan jumlah populasi yang maksimum.

Data yang diperoleh dari perhitungan sel dan kadar lipid dianalisa dengan metode analisa statistik *One Way ANOVA* yang menggunakan software SPSS versi 16.0.

