

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Pengambilan data penelitian diperoleh dari perhitungan kelimpahan sel *Chlorella* sp. tiap perlakuan. Data di analisa menggunakan statistik *One Way Anova* dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan konsentrasi yang berbeda yaitu 15%, 20%, 25%, 30% dan kontrol. Masing-masing perlakuan di ulang sebanyak 3 kali ulangan. Data kandungan lipid diperoleh dari uji soklet dan data analisis sampel limbah cair tahu sebelum dilakukan kultivasi diolah dengan teknik analisis diskriptif eksploratif.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Juli 2012 bertempat di Laboratorium Ekologi dan Sumber Daya Alam Hayati dan 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 1000 ml, beaker glass 250 ml, tabung reaksi 100 ml, gelas ukur 100 ml, pengaduk kaca, lemari es, hand counter, neraca elektrik, mikroskop, pH-meter, haemocytometer,

lux meter, timer, lampu TL berkekuatan 20 watt, enkas, autoklav, pipet tetes, aerator dan inkubator.

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

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan 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. Skema kerja penelitian selengkapnya disajikan pada lampiran 1.

Sterilisasi bahan (media kultur) dilakukan secara sterilisasi bertahap (tyndalisasi). Pada hari pertama cairan dipanaskan 60°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu 10°C dan dibiarkan pada suhu tersebut hingga hari berikutnya. Pada hari kedua dilakukan pemanasan seperti halnya pada hari pertama. Pada hari ketiga siklus tersebut diulang kembali.

3.4.2 Persiapan Limbah Sebagai Media Kultivasi *Chlorella* sp.

Air limbah yang digunakan sebagai medium *Chlorella* sp., dalam penelitian ini adalah berasal dari pengendapan tahu yang berasal dari Dusun Tegal Pasangan Desa Pakis Jajar Kecamatan Pakis Kabupaten Malang.

Medium yang digunakan untuk kultivasi *Chlorella* sp. terbuat dari limbah cair tahu dengan konsentrasi 15%, 20%, 25%, dan 30%. berdasarkan hasil penelitian pendahuluan dari konsentrasi 1% - 10%, semakin tinggi konsentrasi limbah cair tahu maka semakin tinggi pula kelimpahan *Chlorella* sp. Oleh karena itu konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi yang tinggi agar mendapatkan kelimpahan sel *Chlorella* lebih baik.

3.4.3 Kultur *Chlorella* sp.

Isolat murni *Chlorella* sp., yang akan dikulturkan diperoleh dari Laboratorium Produktivitas dan Lingkungan Perairan (ProLing) Institut Pertanian Bogor, wadah kultur yang digunakan adalah Erlenmeyer ukuran 1000 ml, yang ditempatkan pada ruang dengan suhu 25 – 28⁰ C, dan ditempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan aerasi dan lampu TL berkekuatan 18 watt sebanyak 6 buah, yang diatur sedemikian rupa agar setiap perlakuan mendapatkan intensitas cahaya sesuai dengan tingkat perlakuan.

Prosedur kerja yang selanjutnya dilakukan pemurnian kultur *Chlorella* sp. dengan metode pengenceran. Sebanyak 8 ml biakan *Chlorella* dari kultur koleksi dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 192 ml MET kemudian dicampur hingga homogen (pengenceran 4%). Kultur selanjutnya diletakkan di rak kultur dan diinkubasi selama kurang lebih 15 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Kultur *Chlorella* yang tumbuh dengan baik dan murni (tanpa kontaminan) diperbanyak lagi secara bertahap. 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 (Prihantini, 2005).

3.4.4 Penginokulasian Sel *Chlorella* sp.

Penginokulasian sel *Chlorella* dilakukan dengan cara sebagai berikut: Kerapatan sel yang diinokulasikan sebesar 50.000 sel/ml disentrifugasi dengan kecepatan 2200 rpm selama 15 menit untuk memisahkan biomassa mikroalga *Chlorella* dari media. Supernatan dibuang dan endapan sel diinokulasikan ke dalam media perlakuan (Prihantini, 2005).

Erlenmeyer yang berisi *Chlorella* sp. untuk kultur perlakuan diletakkan di rak kultur dan diberi pencahayaan dari 4 buah lampu TL masing-masing berkekuatan 18 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. Penghitungan jumlah sel untuk mendapatkan data kerapatan sel dilakukan setiap 24 jam sekali mulai t₀ (hari ke-0) hingga t₁₀ (hari ke-10).

3.4.5 Perlakuan Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga perlakuan dan setiap kali perlakuan terdiri dari tiga kali ulangan, perlakuan berupa konsentrasi yang berbeda, yaitu 15%, 20%, 25%, 30% dan kontrol. Untuk mengetahui kepadatan populasi sel dari setiap perlakuan dilakukan pengamatan setiap hari, dari hasil yang diperoleh diharapkan dapat diketahui kepadatan sel *Chlorella* sp., tertinggi.

3.4.6 Pengenceran Penelitian

1. Dilakukan pengenceran *Chlorella* sp. sebanyak 10^1 .
2. Diambil pengenceran dengan cara mengambil pembiasaan *Chlorella* sp. sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades. Campuran tersebut diperoleh pengenceran I (10^1).
3. Dihitung hasil pengenceran I sebanyak 0.5 ml menggunakan mikroskop

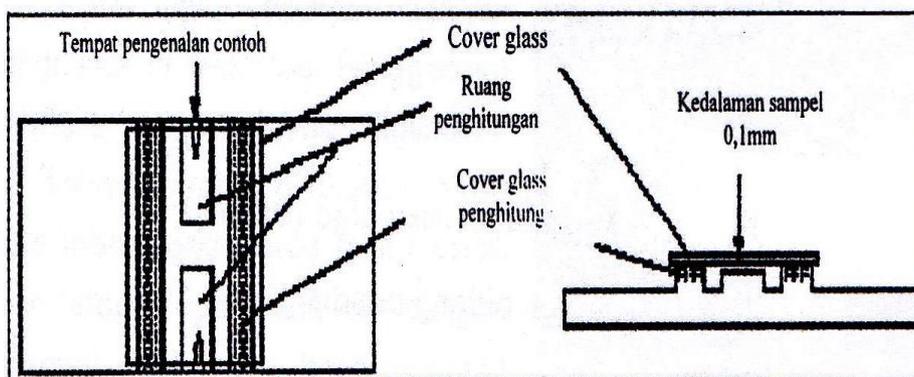
3.4.7 Pengamatan Penelitian

Parameter yang diamati selama penelitian meliputi:

1. Kelimpahan sel *Chlorella* sp. (sel/ml) setiap hari selama 10 hari pada penelitian utama.
2. Kadar lemak yang dihasilkan oleh *Chlorella* sp.

3.4.8. Perhitungan Kepadatan Sel *Chlorella* sp.

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



Gambar *Haemocytometer neubauer improved* (Kawaroe, 2010).

Hasil penghitungan kelimpahan sel *Chlorella* sp. per hari kemudian diplotkan untuk membuat kurva pertumbuhan sel dengan sumbu X menunjukkan hari kultivasi dan sumbu Y sebagai kelimpahan sel *Chlorella* sp.

Penghitungan dengan *haemocytometer* menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), dihitung menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

- D : Jumlah sel/ml
- 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

3.4.9 Teknik Pemanenan Alga (Kawaroe, dkk, 2010)

Pemanenan mikroalga dilakukan pada akhir fase eksponensial. Mikroalga dipanen dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring yang telah diketahui beratnya dan dibilas dengan akuades. Kertas saring dan hasil panen kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam kemudian ditimbang. Berat

kering panen mikroalga didapat dari mengurangi berat kering kertas saring dan mikroalga dengan berat kering kertas saring (Pangabean, 2010).

3.4.10 Analisis Kadar Lemak dengan metode Soxhlet (Sudarmadji, 1997)

Sampel mikroalga sebesar 2 g (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 dimasukan ke mesin rotari evaporator hingga semua pelarut lemak menguap. Pelarut dikeluarkan sehingga tidak kembali ke dalam labu lemak, selanjunya labu lemak dialiri gas N₂, setelah itu labu didinginkan dalam desikator sampai beratnya konstan (W3). Perhitungan kadar lemak adalah sebagai berikut :

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

W1

Keterangan :

W1 : berat sampel (g)

W2 : berat labu lemak kosong (g)

W3 : berat labu lemak dengan lemak (g)

3.4.11 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik, metode yang digunakan untuk menganalisis data dari hasil perhitungan kelimpahan sel adalah secara deskriptif. Perhitungan jumlah populasi dilakukan setiap hari dari hari perhitungan awal sampai hari ke-10 ($H_0 - H_{10}$). Hasil yang didapat digunakan untuk mengetahui jumlah populasi maksimum yang dapat dicapai. Hasil setiap perlakuan tersebut dibandingkan sehingga akan diketahui perlakuan yang terbaik yang dapat memberikan jumlah populasi yang maksimum.

Data yang diperoleh dari perhitungan sel dan kadar lipid dianalisa dengan analisa statistik *One Way Anova* metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan pemberian konsentrasi limbah cair tahu yaitu 15%, 20%, 25%, 30%, yang masing-masing perlakuan mendapatkan 3 kali ulangan.