

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya dan Laboratorium Tanah dan Pupuk PT. Perkebunan Nusantara X, Pusat Penelitian Gula, Penataran Djengkol-Posoklaten, Kediri. Waktu penelitian dilaksanakan dimulai bulan Agustus 2010 sampai bulan Juni 2011.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan penelitian

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain sampel tinja (feces) sapi yang diperoleh dari RPH Sidoarjo, isolat murni ulat grayak kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi UNAIR (*Bacillus sp.*; *Cellulomonas sp.*; *Cytophaga sp.*; dan *Pseudomonas sp.*), media NA (*Nutrient Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), media CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), NH_4NO_3 , NaCl, *Bacto Agar*, *Yeast Extract*, reagen congo-red, reagen NaOH 5%, aquades, spiritus, alkohol 70%.

3.2.2. Alat penelitian

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain *autoclave*, *laminar air-flow*, spektrofotometer, *waterbath*, alat penggojog (*reciprocal shaking incubator*),

neraca analitik, *colony counter*, oven, inkubator, penangas, lemari es, vortex, *cuvet glass*, gelas ukur 10 mL, pipet volume 10 mL, pipetor, mikro pipet 1000 μ L, tip pipet, cawan petri, botol kultur (100 mL; 250 mL; dan 500 mL), spatula, labu *erlenmeyer* (100 mL; 500 mL ;dan 1000 mL), *beaker glass* (100 mL; 500 mL), *furnace*, *exicator* (desikator) dan *silica gel*, reaktor (miniatur *septic tank*), *soil tester*, filter kertas, alat pencapit, corong, jarum ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, batang pengaduk, sarung tangan, masker, spidol, kantong plastik, kapas, *aluminium foil*, tissue, selotip, kertas sampul coklat, dan label.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Preparasi isolat bakteri ulat grayak (*Spodoptera litura*)

Pada penelitian ini menggunakan isolat murni ulat grayak kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi UNAIR yang terdiri dari 4 spesies bakteri yaitu: *Bacillus sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Cytophaga sp.*, dan *Pseudomonas sp.*.

3.3.1.1. Tahap *screening* isolat murni bakteri

Tahap *screening* dilakukan untuk menguji secara kualitatif kemampuan masing-masing isolat bakteri dalam mendegradasi selulosa dengan menggunakan media CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), reagen congo-red, dan reagen NaOH 5%. Masing-masing isolat ditumbuhkan dalam media CMC dengan metode *streak* dan diinkubasi selama 3 hari. Setelah diinkubasi, menuang 2 mL reagen congo-red ke dalam masing-masing biakan dan diamkan selama 30 menit. Setelah itu, membilas

dengan 15 mL NaOH 5%. Hasil positif menunjukkan di daerah sekitar koloni terbentuk zona halo/bening.

3.3.1.2. Peremajaan isolat murni bakteri

Masing-masing kultur murni bakteri ditanam secara aseptik pada setiap tabung reaksi yang berisi media NA (*Nutrient Agar*) padat miring, kemudian diinkubasikan pada inkubator selama 24 jam dengan suhu $\pm 37,0^{\circ}\text{C}$.

3.3.1.3. Tahap pembuatan starter konsorsium bakteri dan pengukuran OD (*Optical Density*)

Pada pembuatan starter konsorsium bakteri yang terdiri dari 4 spesies bakteri (*Bacillus sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Cytophaga sp.*, dan *Pseudomonas sp.*), masing-masing kultur isolat yang sudah mengalami peremajaan, disuspensikan dalam media sebanyak 200 mL cair NB dengan mengambil sebanyak 2 ose untuk setiap biakan isolat bakteri. Setelah itu, tiap starter inokulum bakteri diinkubasikan dengan menggunakan alat penggojog (*reciprocal shaking incubator*) dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam. Selanjutnya, melakukan pengukuran OD tiap spesies kultur inokulum bakteri dengan mengambil 5 mL suspensi starter bakteri pada cuvet, mengukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm hingga didapat nilai absorbansi 0,5, dan mengambil 1 mL suspensi starter bakteri yang sudah diukur OD-nya untuk menghitung nilai TPC dengan metode *pour plate*, kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu $\pm 37,0^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

Sisa starter tiap inokulum bakteri yang telah diukur OD-nya disatukan dan dituang ke dalam 2700 mL media cair NB dengan mengambil 75 mL tiap starter

inokulum bakteri sehingga didapatkan starter konsorsium sebanyak 3000 mL. Setelah itu, starter konsorsium bakteri diinkubasikan dengan menggunakan alat penggojog (*reciprocal shaking incubator*) dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam. Selanjutnya, melakukan pengukuran OD dengan mengambil 5 mL suspensi starter bakteri pada cuvet, mengukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm hingga didapat nilai absorbansi 0,5, dan mengambil 1 mL suspensi starter bakteri yang sudah diukur OD-nya untuk menghitung nilai TPC dengan metode *pour plate*, kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu $\pm 37,0^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

Starter konsorsium bakteri dengan konsentrasi 5% memerlukan 20 mL suspensi konsorsium bakteri ($5/100 \times 400 \text{ mL} = 20 \text{ mL}$ konsorsium, tiap inokulum 5 mL). Pada konsorsium bakteri dengan konsentrasi 10% memerlukan 40 mL suspensi konsorsium bakteri ($10/100 \times 400 \text{ mL} = 40 \text{ mL}$ konsorsium, tiap inokulum 10 mL). Sedangkan, konsorsium bakteri dengan konsentrasi 15% memerlukan 60 mL suspensi konsorsium bakteri ($15/100 \times 400 \text{ mL} = 60 \text{ mL}$ konsorsium, tiap inokulum 15 mL).

3.3.2. Preparasi feces sapi

Sampel feces sapi yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak $\pm 20 \text{ kg}$. Sampel feces sapi ditimbang sebanyak 400 g untuk dimasukkan ke dalam masing-masing reaktor pada setiap perlakuan. Setelah itu, diencerkan dengan 400 mL aquades dan homogenkan dengan mengaduknya hingga merata.

3.3.3. Tahap pemberian starter konsorsium bakteri pada substrat

Pemberian starter konsorsium bakteri pada setiap sampel perlakuan menggunakan konsentrasi 0% (kontrol), 5%, 10%, dan 15% dari 400 g berat sampel tinja sapi yang digunakan. Pada perlakuan sampel dengan konsentrasi konsorsium 5% diberikan 20 mL starter konsorsium bakteri. Perlakuan sampel dengan konsentrasi konsorsium 10% diberikan 40 mL starter konsorsium bakteri. Sedangkan, perlakuan sampel dengan konsentrasi konsorsium 15% diberikan 60 mL starter konsorsium bakteri.

Setiap perlakuan pada sampel feces sapi dilakukan tiga kali pengulangan dengan kombinasi setiap waktu inkubasinya (1, 2, 3, dan 4 minggu). Setelah itu, diinkubasi selama 28 hari pada masing-masing reaktor dan menganalisis nilai C-organik, TSS (*Total Suspended Solid*), dan TPC (*Total Plate Count*) tiap minggu yang ditentukan. Perhitungan nilai C-organik, TSS (*Total Solid Suspended*), dan TPC (*Total Plate Count*) pada perlakuan dengan konsentrasi 0% (kontrol) dilakukan pada saat sebelum diinkubasi sebagai nilai kontrol awal.

3.3.4. Penentuan kadar C-organik dengan metode pengabuan

Untuk mengukur kadar C-organik (%) pada sampel kontrol dan sampel perlakuan dengan waktu inkubasi yang sudah ditentukan, dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1. Menimbang cawan porcelain (A)
2. Memasukkan sampel sampai beratnya 1 gram (B)

3. Memasukkan ke dalam oven dengan suhu 105 °C selama 4 jam
4. Mendinginkan sampel di dalam desikator selama ± 5 menit, kemudian ditimbang (C)
5. Setelah itu, memasukkan sampel ke dalam furnees dengan suhu 600 °C selama 4 jam
6. Mendinginkan sampel di dalam desikator selama ±10 menit, kemudian ditimbang (D)

Keterangan:

- A. Berat cawan
- B. Berat cawan + sampel
- C. Berat cawan + sampel setelah di oven 105 °C
- D. Berat cawan + sampel setelah di oven 600 °C

Perhitungan

$$\% \text{ Kadar air} = (B-C)/(B-A) \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar abu} = (D-A)/(B-A) \times 100\%$$

$$\% \text{ Berat organik} = 100 - (\text{Kadar air} + \text{Kadar abu})$$

$$\% \text{ C - organik} = \frac{\text{berat organik}}{1,724}$$

(1,724 = Faktor 100/58)

(Sumber: Sulaiaman dan Eviati, 2009)

3.3.5. Penentuan TSS (*Total Suspended Solid*) dengan metode gravimetri

Untuk mengukur nilai TSS (*Total Suspended Solid*) pada sampel kontrol dan sampel perlakuan dengan waktu inkubasi yang sudah ditentukan, dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1. Memanaskan filter kertas di dalam oven pada suhu ± 105°C selama 1 jam. Mendinginkan dalam exicator selama ±15 menit dan kemudian menimbang dengan cepat.

2. Memindahkan sampel yang sudah diaduk merata sebanyak 100 mL dengan menggunakan pengaduk ke dalam alat penyaringan yang sudah ada filter kertas di dalamnya. Kemudian menyaring dengan menggunakan corong.
3. Mengambil filter kertas dari alat penyaring dengan hati-hati dan kemudian meletakkan pada cawan (bila memakai cawan petri, filter beserta cawan petri) lalu memasukkan dalam oven untuk dipanaskan 105°C, selama 1 jam. mendinginkan dalam desikator \pm 15 menit kemudian menimbang dengan cepat.

Perhitungan

$$\text{zat tersuspensi } \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{(a-b) \times 1000}{c} \text{ atau } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(a-b)}{c}$$

Keterangan:

a= berat filter dan residu sesudah pemanasan 105°C

b= berat filter kering sesudah pemanasan 105°C

c= sampel (mL)

(Sumber: Alaerts dan Santika, 1987)

3.3.6. Uji TPC (*Total Plate Count*) dengan metode hitungan cawan

Untuk menghitung nilai TPC (*Total Plate Count*) (CFU/mL) pada sampel kontrol dan sampel perlakuan dengan waktu inkubasi yang sudah ditentukan, dilakukan seri pengenceran dengan cara sebagai berikut.

1. Mengambil 10 mL sampel dan mencampur dengan 90 mL air fisiologis (10^{-1}) dan homogenkan.

2. Setelah itu, mengambil 1 mL dari seri pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL air fisiologis (10^{-2}) dan homogenkan. Selanjutnya, melakukan hal yang sama sampai seri pengenceran tertentu (10^{-n}).
3. Memasukkan 1 mL sampel dari 2 seri pengenceran terakhir ke dalam masing-masing cawan petri.
4. Menambahkan media CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) sebanyak 15 mL untuk di *pour plate*, kemudian homogenkan dengan cara memutar-mutar cawan ke kiri dan ke kanan dan memutar-mutar cawan seperti angka delapan.
5. Menginkubasi dengan inkubator pada suhu $\pm 37,0$ °C selama 24 jam.
6. Menghitung jumlah koloni bakteri menggunakan *Colony Counter* dengan persyaratan jumlah koloni bakteri yang tumbuh 30-300 koloni/cawan.

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan faktorial 4x4. Perlakuan terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama (M) adalah waktu inkubasi yang terdiri dari 4 taraf, yaitu inkubasi 1, 2, 3, dan 4 minggu. Faktor kedua (K) adalah konsentrasi konsorsium bakteri yaitu 0% (sebagai kontrol), 5%, 10%, dan 15% sehingga ada 16 kombinasi perlakuan. Pada tiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan.

Tabel 3.1. Rancangan faktorial 4x4

Waktu inkubasi (Minggu)	Konsentrasi konsorsium bakteri (%)			
	K ₀	K ₁	K ₂	K ₃
M ₁	M ₁ K ₀	M ₁ K ₁	M ₁ K ₂	M ₁ K ₃
M ₂	M ₂ K ₀	M ₂ K ₁	M ₂ K ₂	M ₂ K ₃
M ₃	M ₃ K ₀	M ₃ K ₁	M ₃ K ₂	M ₃ K ₃
M ₄	M ₄ K ₀	M ₄ K ₁	M ₄ K ₂	M ₄ K ₃

Keterangan:M₁ =Waktu inkubasi 1 mingguM₂ =Waktu inkubasi 2 mingguM₃ =Waktu inkubasi 3 mingguM₄ =Waktu inkubasi 4 mingguK₀ =Konsentrasi konsorsium bakteri 0% dari berat substrat (v/w)K₁ =Konsentrasi konsorsium bakteri 5% dari berat substrat (v/w)K₂ =Konsentrasi konsorsium bakteri 10% dari berat substrat (v/w)K₃ =Konsentrasi konsorsium bakteri 15% dari berat substrat (v/w)**3.5. Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut.

- 1) Variabel bebas : konsentrasi konsorsium bakteri (%), lama waktu inkubasi (minggu), dan kombinasi konsentrasi konsorsium bakteri (%) dan lama waktu pengomposan (minggu).
- 2) Variabel terikat : C-organik (%), dan TSS (*Total Suspended Solid*) (mg/L).
- 3) Variabel terkontrol : jenis feces, berat sampel feces sapi (400 g), dan volume aquades pengenceran feces sapi (400 mL).

3.6. Pengumpulan Data

Penentuan kadar C-organik, TSS (*Total Suspended Solid*), dan TPC (*Total Plate Count*) dari degradasi bakteri selulolitik ulat grayak (*Spodoptera litura*) pada feces sapi dilakukan pada minggu ke-1, 2, 3 dan 4 (lampiran 3).

3.7. Analisis Data

Berdasarkan rancangan penelitian yang telah disusun, maka data yang berupa nilai TPC (*Total Plate Count*) dianalisis secara deskriptif sebagai data sekunder. Data nilai TPC merupakan jumlah koloni bakteri/mL (CFU/mL) yang didapatkan dari hasil perkalian jumlah koloni yang tampak dengan 1/faktor pengenceran.

Data yang berupa kadar C-organik, dan nilai TSS (*Total Suspended Solid*) dianalisis secara statistik menggunakan *Two-way Analysis of Varians* (ANAVA) dan *Brown Forsythe* (derajat signifikansi 5%, $\alpha=0,05$). Uji ANAVA dilakukan atas dasar asumsi bahwa data berdistribusi normal yang dapat diuji dengan *One sample Kolmogorov-Smirnov* dan varians data homogen yang dapat diuji dengan *Test of Homogeneity of Variances*. Jika $p<0,05$ (ada beda nyata) pada uji ANAVA, maka analisis dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Uji *Brown Forsythe* dilakukan atas dasar asumsi bahwa data berdistribusi normal dan variansi data tidak homogen. Jika $p<0,05$ (ada beda nyata) pada uji *Brown Forsythe* maka analisis dilanjutkan dengan uji

Games-Howell. Cara pengambilan keputusan data dari uji ANAVA dan *Brown*

Forsythe adalah:

Jika diperoleh $p > \alpha$ maka H_0 diterima dan H_1 ditolak

Jika diperoleh $p < \alpha$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima

