

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Terpadu, Departemen Biologi Universitas Airlangga, Surabaya pada bulan September 2014 sampai Januari 2015.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bahan organik berupa bahan baku kompos dari rumah kompos Keputran, Surabaya, kotoran sapi segar yang berasal dari peternakan sapi perah di daerah Jalan Kaliwaron, Surabaya. Pakan sapi perah berupa rumput, ampas tahu, dan kulit singkong. Selain itu, bahan lain yang digunakan adalah media *Nutrient Broth* (NB) *Merck*, media *Nutrient Agar* (NA) *Oxoid*, *Malt Extract* (ME) *Oxoid*, *Yeast Extract* (YE) *Oxoid*, *dextrose*, glukosa, molase, *reducing agent* (*Anaerogen*), asam asetat, akuades, isolat murni bakteri hidrolitik *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Cellulomonas* sp., *Cytophaga* sp., *Cellvibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus plantarum* dan *Acetobacter aceti*. Isolat murni bakteri hidrolitik yang digunakan berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Selain itu, bahan yang digunakan untuk analisis rasio C/N adalah K_2SO_4 , $CuSO_4$, Zn, batu didih, NaOH 45 %, HCl 0,1 N,

NaOH 0,1 N, H₂SO₄ pekat dan indikator *phenolphthalein* (PP) 1 %. Beberapa bahan penelitian ditampilkan pada Lampiran 6.

3.2.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bioreaktor *batch* skala laboratorium volume 1.500 mL berbahan plastik sebagai tempat fermentasi, selang plastik, kantong plastik ukuran 2 Kg, karet gelang, volumemeter dan *gasometer electric* untuk analisis biogas di Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya, *Laminar Air Flow* (LAF), *soil tester* untuk mengukur kelembapan dan pH substrat, termometer untuk mengukur suhu substrat, autoklaf *Ogawa Seiki 6500* untuk mensterilkan alat dan bahan yang digunakan, neraca analitik *Shimadzu UY 220* dengan ketelitian 4 angka di belakang koma untuk menimbang media NA, NB, ME, YE, *dextrose*, glukosa, Zn, K₂SO₄ dan CuSO₄, neraca *Ohaus Scout Pro* dengan ketelitian 1 angka di belakang koma untuk menimbang kotoran sapi dan bahan baku kompos, inkubator *Heraus instruments*, spektrofotometer *spectronic 20 Milton Roy Company* untuk menentukan nilai *Optical Density* (OD) pada konsorsium bakteri hidrolitik, *colony counter galaxy 230* untuk menghitung koloni bakteri hidrolitik, bakteri pada bahan baku kompos dan kotoran sapi, kompor listrik, *shaker*, *waterbath*, *vortex*, *anaerobic jar*, mikroskop binokuler, pembakar bunsen, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, gelas Beaker, gelas ukur, labu ukur, botol kultur, cawan Petri, pipet volume, *vein*, mikropipet, *tip*, jarum ose, korek api, kapas, kertas label, *aluminium foil*, tissue, spatula dan *cling wrap*. Selain itu, alat yang digunakan untuk analisis rasio C/N

antara lain labu destruksi, labu Kjeldahl, alat destilasi, alat titrasi, *furnace* dan desikator. Beberapa alat penelitian ditampilkan pada Lampiran 6.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap pembuatan konsorsium bakteri hidrolitik

Bakteri yang dijadikan konsorsium antara lain *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Cellulomonas* sp., *Cytophaga* sp., *Cellvibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus plantarum* dan *Acetobacter aceti*. Pembuatan konsorsium bakteri hidrolitik diawali dengan penyiapan media untuk bakteri hidrolitik tersebut. Media NA sebanyak 2,8 g dilarutkan dalam 100 mL akuades pada gelas Beaker. Selanjutnya, media tersebut dipanaskan di atas kompor listrik hingga mendidih dan larut sempurna. Media NA dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 6 mL, ditutup rapat dengan kapas dan dilapisi dengan *aluminium foil*. Kemudian, media NA disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 - 20 menit. Tabung reaksi berisi media NA dimiringkan hingga memadat.

Peremajaan isolat murni bakteri hidrolitik dilakukan dengan cara masing-masing isolat bakteri tersebut diambil 1 jarum ose kemudian diinokulasikan pada media NA miring steril dengan metode *streak* secara aseptis, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$).

Sebanyak 3 jarum ose biakan isolat bakteri hasil peremajaan disuspensikan dalam 50 mL media NB + glukosa 1 % steril dalam botol kultur dan diinkubasikan selama 24 jam menggunakan *shaker* dengan agitasi 120 rpm pada

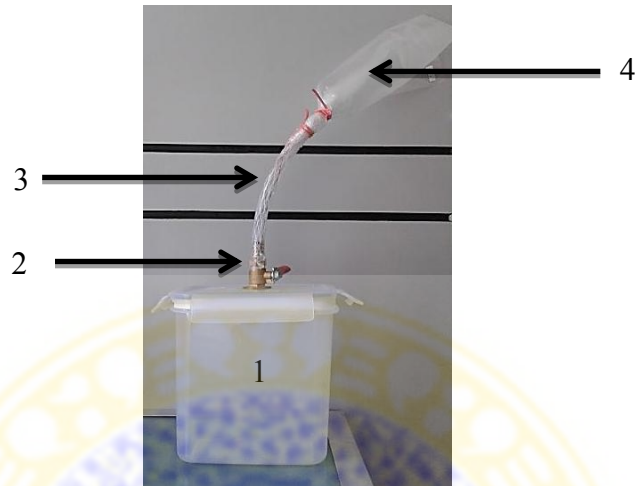
suhu ruang ($\pm 27^\circ \text{C}$). Nilai *Optical Density* (OD) dari masing-masing kultur cair bakteri kemudian diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm sampai didapatkan nilai OD sekitar 0,2. Suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 1 mL lalu dituang ke cawan Petri dengan metode *pour plate* dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang ($\pm 27^\circ \text{C}$). Hal ini dilakukan untuk mengetahui jumlah koloni dengan parameter *Total Plate Count* (TPC). Jika OD telah mencapai 0,2 masing-masing bakteri ditambah dengan molase 1 % sebanyak 50 mL. Selanjutnya kultur bakteri tersebut diinkubasi selama 48 jam.

Pada penelitian ini, konsorsium bakteri yang dibutuhkan untuk satu kali ulangan adalah sebanyak 600 mL. Konsorsium bakteri yang dibuat adalah sebanyak 700 mL untuk mencegah kekurangan. Sebanyak 87,5 mL dari masing-masing kultur cair bakteri dicampurkan menjadi satu. Sehingga volume total konsorsium tersebut sebanyak 700 mL.

3.3.2 Tahap persiapan bioreaktor

Bioreaktor yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 12 untuk satu kali ulangan. Rangkaian bioreaktor bervolume 1.500 mL terbuat dari bahan plastik dengan penutup kedap udara, kran, selang, karet gelang, *cling wrap* dan kantong plastik. Bagian penutup terhubung dengan kran yang tersambung dengan selang. Selang terhubung dengan penampung gas berupa kantong plastik yang diikat dengan karet gelang dan dirapatkan dengan *cling wrap*. Pada masing-

masing bioreaktor diberi label sesuai dengan perlakuan. Desain bioreaktor ditampilkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Desain bioreaktor. Keterangan: 1) Bioreaktor; 2) Kran; 3) Selang; 4) Plastik penampung gas

3.3.3 Tahap isolasi bakteri dari bahan baku kompos dan kotoran sapi

Isolasi bakteri dari bahan baku kompos dan kotoran sapi bertujuan untuk mengetahui jumlah bakteri aerob dan anaerob yang ada pada substrat tersebut. Caranya dengan mengambil sampel bahan baku kompos dan kotoran sapi masing-masing sebanyak 10 g, kemudian masing-masing sampel tersebut secara aseptik dimasukkan ke dalam 90 mL akuades steril pada botol kultur. Selanjutnya kedua botol kultur tersebut dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*, kemudian didiamkan beberapa menit sampai mengendap. Untuk isolasi bakteri aerob, sebanyak 1 mL dari suspensi tersebut diambil kemudian dilakukan seri pengenceran hingga 10^{-8} . Selanjutnya 3 pengenceran terakhir diambil 1 mL dan dimasukkan ke cawan Petri. Kemudian ditambahkan media NA pada cawan Petri tersebut. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Setelah

inkubasi, jumlah koloni dihitung menggunakan *colony counter*. Hal ini dilakukan untuk penghitungan koloni bakteri dengan parameter TPC. Untuk isolasi bakteri anaerob, sebanyak 1 mL dari suspensi di botol kultur diambil kemudian dilakukan seri pengenceran hingga 10^{-3} . Dari masing-masing pengenceran tersebut diambil 1 mL dan dituangkan ke dalam cawan Petri. Kemudian ditambahkan asam asetat 1 % sebanyak 1 mL dan media NA modifikasi (terdiri atas *Nutrient Agar*, *Malt Extract*, *Yeast Extract* dan *dextrose*). Selanjutnya dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* yang telah diberi *reducing agent* (*Anaerogen*) dan diinkubasi selama 5 hari. Kemudian koloni bakteri dihitung menggunakan *colony counter*.

3.3.4 Tahap pembuatan substrat

Substrat yang digunakan terdiri atas bahan baku kompos yang berupa bahan-bahan organik, kotoran sapi segar, dan konsorsium bakteri hidrolitik. Penelitian ini menggunakan konsentrasi konsorsium bakteri pada masing-masing bioreaktor sebesar 10 % (v/v) dari volume total substrat. Volume total substrat dalam masing-masing bioreaktor sebanyak 500 mL, tetapi karena kelembapan substrat masih belum mencukupi, maka dilakukan penambahan air sebanyak 200 mL pada masing-masing substrat. Terdapat variasi perbandingan bahan baku kompos dengan kotoran sapi (w/w). Perbandingan tersebut antara lain 1:2, 1:1, dan 2:1. Untuk tiap variasi perbandingan, terdapat komposisi bahan yang disajikan dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi bahan pada tiap variasi perbandingan bahan baku kompos dengan kotoran sapi

Perbandingan	Komposisi Substrat			Volume Substrat (mL)
	Bahan Baku Kompos (g)	Kotoran Sapi (g)	Konsorsium Bakteri (mL)	
1:2	150	300	50	500
1:1	225	225	50	500
2:1	300	150	50	500

Substrat yang telah dibuat diukur rasio C/N, kelembapan, pH dan suhunya. Kelembapan dan pH pada substrat diukur dengan menggunakan *soil tester* sedangkan suhu diukur dengan termometer. Analisis rasio C/N dan pengukuran kelembapan, pH serta suhu pada substrat ini adalah sebagai data pelengkap dalam penelitian.

3.3.5 Tahap fermentasi untuk produksi biogas

Sistem fermentasi untuk produksi biogas dalam penelitian ini menggunakan sistem tertutup (*Batch fermentation*). Volume substrat yang dimasukkan ke dalam reaktor sebesar 500 mL. Reaktor yang telah berisi substrat diletakkan pada suhu ruang dengan waktu fermentasi yang berbeda yaitu 10 hari, 20 hari, 30 hari dan 40 hari. Setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. Biogas yang terbentuk akan mengisi ruang pada bioreaktor, kemudian berpindah menuju selang hingga tertampung pada penampung gas. Gas yang tertampung langsung dianalisis sesuai dengan waktu fermentasinya.

3.3.6 Tahap analisis biogas

Analisis biogas dilakukan dengan melihat parameter kadar metana dan volume biogas. Sampel biogas dalam kantong plastik diambil, lalu volume biogas diukur terlebih dahulu dengan menggunakan volumemeter. Alat ini berupa gelas ukur tertutup yang memiliki membran di dalamnya dan lubang sebagai saluran masuk gas. Membran tersebut sangat sensitif terhadap gas. Dengan adanya gas maka membran tersebut dapat terangkat. Awalnya kantong plastik yang berisi sampel biogas diambil dan gas dimasukkan ke gelas ukur dengan bantuan kompressor. Adanya pertambahan gas maka akan menggerakkan membran sehingga membran terangkat dan menunjukkan angka pada gelas ukur. Angka tersebut menunjukkan volume biogas. Selanjutnya biogas yang tertampung pada volumemeter digunakan kembali untuk pengukuran kadar metana (CH_4) dengan metode absorpsi menggunakan alat *gasometer electric*.

Massa sampel biogas (a) diukur berdasarkan selisih dari massa sampel biogas dalam kantong plastik dengan massa kantong plastik saja. Pengukuran massa sampel biogas dilakukan sebelum pengukuran volume. Bahan penyerap atau absorben gas metana berupa trietanolamin murni ditimbang sebagai massa absorben awal (b). Sampel biogas dimasukkan ke dalam alat *gasometer electric* hingga memasuki kolom absorpsi yang berisi trietanolamin sehingga gas metana akan terserap dengan trietanolamin menjadi metil-dietanolamin dan air. Hasil reaksi tersebut akan menyebabkan penambahan massa pada cairan absorben, massa ini kemudian ditimbang menjadi massa absorben akhir (c). Kadar metana dihitung berdasarkan persamaan berikut.

$$\text{Kadar metana (\% w/v)} = \frac{c-b}{a} \times 100 \%$$

(Sumber : Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya, 2014)

3.3.7 Tahap analisis rasio C/N

Analisis rasio C/N dilakukan dengan pengukuran kandungan C-organik dan total nitrogen yang ada pada sampel.

1. Analisis C-organik

Analisis C-organik yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan metode pengabuan. Cara analisis C-organik yaitu dengan menimbang cawan kosong (a) kemudian ditambahkan sampel untuk setiap perlakuan sebanyak 1 g. Berat cawan dan sampel dijumlahkan (b). Selanjutnya cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam oven selama 4 jam pada suhu 105° C. Setelah itu cawan tersebut didinginkan di dalam desikator selama 15 menit. Setelah itu, berat cawan dan sampel setelah dikeluarkan dari desikator ditimbang kembali (c). Langkah berikutnya adalah memasukkan cawan yang berisi sampel ke dalam *furnace* bersuhu 600° C selama 4 jam. Setelah itu, cawan dimasukkan ke dalam desikator, kemudian dikeluarkan dan menimbang berat akhirnya (d). Perhitungan untuk analisis ini menggunakan persamaan sebagai berikut.

$$\% \text{ kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100 \%$$

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{d-a}{b-a} \times 100 \%$$

$$\% \text{ bahan organik} = 100 - (\% \text{ kadar air} - \% \text{ kadar abu})$$

$$\% \text{ C-organik} = \% \text{ bahan organik} \times \frac{58}{100}$$

Keterangan : $\frac{58}{100}$ adalah konversi bahan organik ke karbon

(Sumber : Sulaeman dan Eviati, 2009)

2. Analisis total nitrogen

Analisis total nitrogen dalam penelitian ini menggunakan metode Gunning. Analisis ini dilakukan dengan 3 tahap yaitu destruksi, destilasi, dan titrasi. Tahap destruksi bertujuan untuk menghancurkan bahan (sampel) dengan penambahan K_2SO_4 dan $CuSO_4$. Sebanyak 1 g sampel dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl kemudian ditambahkan 10 mL H_2SO_4 pekat, 5 g K_2SO_4 , 0,3 g $CuSO_4$ dan batu didih. Selanjutnya, campuran tersebut dipanaskan pada pemanas listrik di dalam lemari asam, mula-mula dengan pemanasan rendah lalu dilanjutkan dengan pemanasan tinggi. Pemanasan diakhiri setelah larutan tersebut tidak berwarna. Sebanyak 100 mL aquades, 1 g Zn dan ± 50 mL NaOH 45 % ditambahkan ke dalam labu Kjeldahl setelah larutannya dingin. Kemudian labu Kjeldahl dipasang pada alat destilasi. Campuran tersebut didestilasi sampai volume destilat yang tertampung sebanyak ± 75 mL.

Tahap titrasi diawali dengan menuangkan 75 mL destilat pada labu titrasi dan ditambahkan dengan 50 mL HCl 0,1 N serta indikator PP. Titran yang digunakan adalah NaOH 0,1 N. Titrasi dilakukan sampai ditemukan volume NaOH yang dibutuhkan untuk menetralsir sampel.

Di samping itu, tahap destruksi, destilasi serta titrasi juga dilakukan untuk blanko, yaitu dengan mengganti sampel dengan akuades. Kadar N (%) dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut.

$$\text{Kadar N (\%)} = \frac{V \text{ NaOH blanko} - V \text{ NaOH sampel}}{\text{massa} \times 1000} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times 100 \%$$

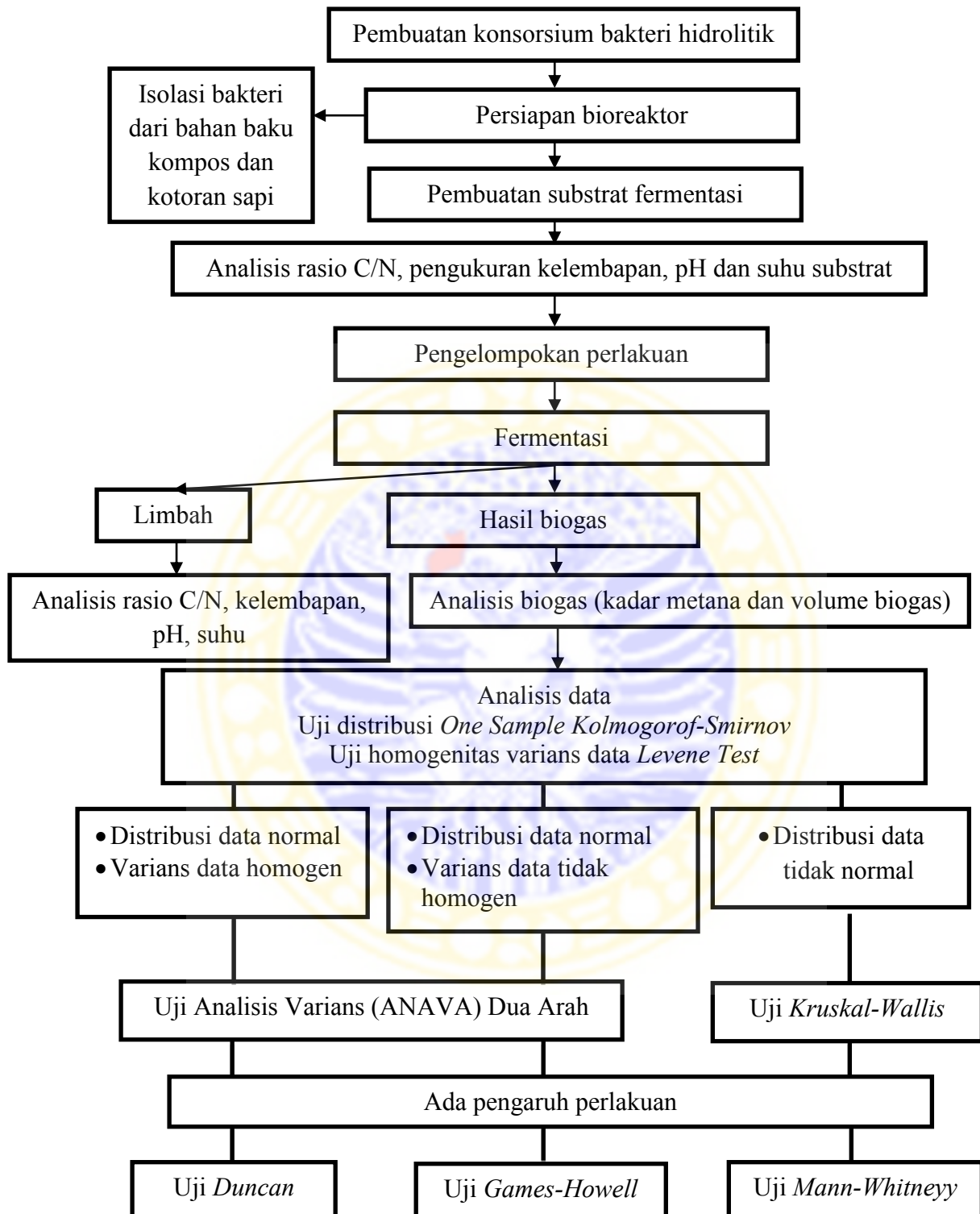
Rasio C/N dapat dihitung setelah didapatkan nilai kadar C-organik dan total nitrogen. Rasio C/N dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut.

$$\text{Rasio C/N} = \frac{\text{kadar C-organik}}{\text{kadar N-total}}$$

(Sumber : Sudarmadji *et al.*, 1984)

Prosedur penelitian secara lengkap disajikan dalam Gambar 3.2.





Gambar 3.2 Skema prosedur penelitian

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan faktorial 3 x 4. Faktor pertama adalah perbandingan bahan baku kompos dan kotoran sapi (F) yang terdiri atas 3 level, yaitu dengan perbandingan 1:2 (F₁), 1:1 (F₂), 2:1 (F₃). Pemberian variasi perbandingan ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan bahan baku kompos dengan kotoran sapi yang paling baik dalam pembentukan biogas. Faktor kedua adalah waktu fermentasi (W) yang terdiri atas 4 level, yaitu 10 hari (W₁), 20 hari (W₂), 30 hari (W₃) dan 40 hari (W₄). Pemberian variasi waktu fermentasi bertujuan untuk mengetahui waktu fermentasi yang paling baik dalam pembentukan biogas. Dari kedua faktor tersebut terdapat 12 perlakuan. Pengulangan dalam penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Tabel rancangan penelitian dengan perlakuan perbandingan bahan baku kompos dengan kotoran sapi serta waktu fermentasi

Waktu Fermentasi (W)	Ulangan	Perbandingan Bahan Baku Kompos: Kotoran Sapi (F)		
		F ₁	F ₂	F ₃
W ₁	I	F ₁ W ₁	F ₂ W ₁	F ₃ W ₁
	II	F ₁ W ₁	F ₂ W ₁	F ₃ W ₁
	III	F ₁ W ₁	F ₂ W ₁	F ₃ W ₁
W ₂	I	F ₁ W ₂	F ₂ W ₂	F ₃ W ₂
	II	F ₁ W ₂	F ₂ W ₂	F ₃ W ₂
	III	F ₁ W ₂	F ₂ W ₂	F ₃ W ₂
W ₃	I	F ₁ W ₃	F ₂ W ₃	F ₃ W ₃
	II	F ₁ W ₃	F ₂ W ₃	F ₃ W ₃
	III	F ₁ W ₃	F ₂ W ₃	F ₃ W ₃
W ₄	I	F ₁ W ₄	F ₂ W ₄	F ₃ W ₄
	II	F ₁ W ₄	F ₂ W ₄	F ₃ W ₄
	III	F ₁ W ₄	F ₂ W ₄	F ₃ W ₄

Keterangan : F₁ = 1:2; F₂ = 1:1; F₃ = 2:1;
 W₁ = 10 hari; W₂ = 20 hari; W₃ = 30 hari; W₄ = 40 hari

3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut.

1. Variabel bebas (*independent variable*), yaitu perbandingan bahan baku kompos dengan kotoran sapi (w/w), waktu fermentasi (hari).
2. Variabel terikat (*dependent variable*), yaitu kadar metana (% w/v), volume biogas (mL), dan rasio C/N.
3. Variabel kontrol (*controlled variable*), yaitu konsentrasi konsorsium bakteri (% v/v), volume total substrat (mL), volume air yang ditambahkan (mL) dan volume media kultur bakteri (mL).

3.6 Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian ini dianalisis menggunakan aplikasi *Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Seluruh hasil yang didapat diuji distribusi datanya dengan *One Sample Kolmogorov-Smirnov Test* dan uji homogenitas varians data dengan *Levene Test*.

Jika didapatkan data berdistribusi normal dan varians data yang homogen, maka uji statistik dilanjutkan dengan menggunakan uji Analisis Varians (ANOVA) Dua Arah dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Jika analisis varians bermakna ($p < 0,05$) atau diketahui terdapat pengaruh dari perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui signifikansi antar perlakuan.

Jika didapatkan data berdistribusi normal dan varians data tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji Analisis Varians (ANOVA) Dua Arah dengan derajat

signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Jika diketahui terdapat pengaruh dari perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Games-Howell* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya signifikansi antar perlakuan.

Jika didapatkan data tidak berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskall-Wallis* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Jika terdapat pengaruh perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dengan derajat signifikansi 5 %.

