

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *gasometer electric*, volumemeter, dan alat untuk pengukuran rasio C/N seperti *furnace*, desikator, alat destilasi, batu didih, alat titrasi di Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya, bioreaktor anaerobik dengan kapasitas volume 1.500 mL, selang plastik, kantong plastik ukuran 1 kg, karet gelang, autoklaf (Ogawa Seiki 6500), neraca analitik (Shimadzu AY220), *shaker*, *anaerobic jar*, termometer, jarum ose, mikropipet, *tip*, *vein*, korek api, kapas, kertas label, *aluminium foil*, tisu, inkubator (Heraeus), kompor listrik (Rommeisbacher), cawan Petri, *cling wrap*, pembakar bunsen, spektrofotometer (Milton Roy Company), *soil tester*, kamera digital (Sony), *colony counter* (Galaxy 230), dan beberapa bahan kaca yang terdiri dari labu Erlenmeyer (Pyrex), gelas Beaker (Pyrex), pengaduk kaca, labu ukur (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), dan pipet volume (Pyrex). Visualisasi alat tersebut ditampilkan pada Lampiran 10.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bahan baku kompos dari rumah kompos Keputran, Surabaya, kotoran sapi segar yang berasal dari peternakan sapi perah di daerah Jalan Kaliwaron, Surabaya. Selain itu, terdapat bahan lain seperti bahan untuk pengukuran rasio C/N yang terdiri atas K_2SO_4 , $CuSO_4$, H_2SO_4 , NaOH 45 %, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, Zn, dan indikator *phenolphthalein* (PP). Beberapa jenis media seperti media *Nutrien Broth* (NB) (Merck), media *Nutrient Agar* (NA) (Merck), glukosa (Merck), media NA modifikasi (*Nutrien Agar, Malt Extract, Yeast Extract, Dextrose*), dan bahan lain seperti molase steril 1 %, akuades, anaerogen, asam asetat 1 %, serta isolat murni bakteri hidrolitik yang terdiri dari *Cellulomonas* sp., *Cytophaga* sp., *Cellvibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus plantarum*, dan *Acetobacter aceti*. Visualisasi bahan-bahan ini ditampilkan pada Lampiran 10.



Gambar 3.1 Lokasi pengambilan bahan penelitian
a. Rumah kompos Keputran, Surabaya; b. Peternakan sapi perah
(Dokumentasi Pribadi)

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Cara kerja

3.3.1.1 Pembuatan konsorsium bakteri hidrolitik

Sebanyak 1,15 g media NA dilarutkan dalam 50 mL akuades pada gelas Beaker. Selanjutnya dipanaskan di atas kompor listrik hingga terlarut sempurna. Media NA dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak kurang lebih 6 mL, ditutup rapat dengan kapas, dan dilapisi dengan *aluminium foil*. Kemudian 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 terdiri dari *Cellulomonas* sp., *Cytophaga* sp., *Cellvibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus plantarum* dan *Acetobacter aceti*. Masing-masing bakteri tersebut diambil sebanyak satu *loop* ose kemudian diinokulasikan ke dalam media NA miring dengan metode *streak* secara aseptis. Inkubasi pada suhu ruang ($\pm 27^\circ\text{C}$) selama 24 jam.

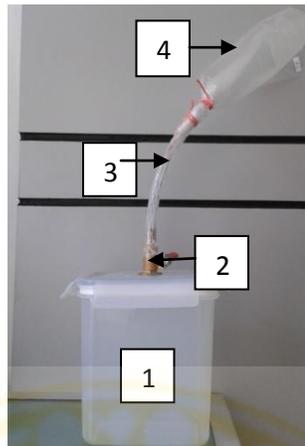
Tiga *loop* ose biakan isolat hasil peremajaan disuspensikan dalam 50 mL media NB + glukosa 1 % steril dalam botol kultur, kemudian inkubasi selama ± 24 jam menggunakan *shaker* dengan agitasi 120 rpm pada suhu ruang ($\pm 27^\circ\text{C}$). Nilai *Optical Density* (OD) dari masing-masing kultur cair bakteri tersebut diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm hingga diperoleh nilai OD sebesar $\pm 0,2$. Sebanyak 1 mL kultur cair bakteri tersebut diambil dan

dituang ke dalam cawan Petri yang berisi media NA dengan metode *pour plate*. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$), lalu untuk mengetahui jumlah koloni dilakukan parameter TPC (*Total Plate Count*). Kultur cair tersebut kemudian ditambahkan dengan molase steril sebanyak 50 mL. Sehingga total volume masing-masing kultur bakteri sebanyak 100 mL. Lalu inkubasi selama 48 jam pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$).

Kebutuhan total volume konsorsium dari seluruh variasi konsentrasi konsorsium bakteri untuk satu kali pengulangan yaitu sebanyak 600 mL, agar tidak terjadi kekurangan volume konsorsium maka ditambah menjadi 800 mL. Masing-masing kultur bakteri sebanyak 100 mL dicampurkan secara aseptis. Sehingga total volume konsorsium bakteri tersebut sebanyak 800 mL.

3.3.1.2 Persiapan bioreaktor

Jumlah bioreaktor yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 48 buah. Rangkaian bioreaktor bervolume 1.500 mL terdiri dari wadah plastik dengan penutup kedap udara. Bagian atas reaktor disertai dengan keran untuk membuka jalur aliran gas metana agar mengalir ke plastik penampungan. Untuk menghubungkan plastik penampungan dengan kran, digunakan selang plastik. Antara selang plastik dengan plastik penampung gas diikat dengan karet gelang dan direkatkan kembali dengan *cling wrap*. Bentuk bioreaktor disajikan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Bentuk bioreaktor. Keterangan: 1. Bioreaktor; 2. Kran; 3. Selang; 4. Penampung gas (Dokumentasi Pribadi)

3.3.1.3 Pembuatan substrat fermentasi

Substrat terdiri dari bahan baku kompos dan kotoran sapi segar. Volume total substrat pada masing-masing bioreaktor sebanyak 500 mL. Berdasarkan hasil penelitian Rahmayanti *et al.* (2013), perbandingan jumlah sampah organik dan kotoran sapi yang optimal untuk produksi biogas yaitu 1 : 1. Total kebutuhan substrat dari seluruh variasi konsentrasi konsorsium bakteri untuk satu kali pengulangan yaitu 7.400 g. Sebanyak 3.700 g kotoran sapi dicampur dengan 3.700 g bahan baku kompos, sehingga diperoleh total substrat sebanyak 7.400 g. Karena substrat tersebut masih kering, maka diberi penambahan air sebanyak 200 mL pada tiap perlakuan. Selanjutnya substrat tersebut dilakukan pengukuran pH dan kelembapan dengan *soil tester*, suhu dengan termometer serta dilakukan pengukuran rasio C/N. Kadar karbon (C) dihitung dengan metode pengabuan dan kadar nitrogen (N) dengan metode Gunning. Data tersebut merupakan data pelengkap penelitian.

3.3.1.4 Pemberian konsorsium bakteri hidrolitik pada substrat

Pada penelitian ini, komposisi dalam bioreaktor terdiri dari substrat, konsorsium bakteri hidrolitik dan air. Substrat ini merupakan campuran kotoran sapi dan bahan baku kompos. Untuk konsentrasi konsorsium bakteri 0 % diambil 500 gram substrat tanpa pemberian konsorsium bakteri. Pada konsentrasi konsorsium bakteri 5 %, sebanyak 25 mL konsorsium bakteri dicampurkan dengan 475 g substrat. Pada konsentrasi konsorsium bakteri 10 %, sebanyak 50 mL konsorsium bakteri dicampurkan ke dalam 450 g substrat. Untuk konsentrasi bakteri 15 %, 75 mL konsorsium bakteri dicampurkan dengan 425 g substrat. Kemudian campuran tersebut dihomogenkan sehingga bakteri konsorsium hidrolitik tersebar merata di dalam substrat.

3.3.1.5 Fermentasi anaerob

Bioreaktor yang digunakan yaitu bioreaktor sistem *batch* (sistem tertutup) skala laboratorium dengan volume total 1.500 mL. Jumlah bioreaktor sebanyak 16 buah dengan tiga kali pengulangan. Volume substrat campuran bahan baku kompos dan kotoran sapi yang digunakan sebanyak 500 mL dengan konsentrasi konsorsium bakteri hidrolitik 0 %, 5 %, 10 % dan 15 %. Bioreaktor diletakkan pada suhu ruang dengan waktu fermentasi 10 hari, 20 hari, 30 hari dan 40 hari. Biogas yang terbentuk akan tertampung di dalam bioreaktor, gas yang terbentuk mengalir ke selang plastik dan tertampung pada kantong plastik. Biogas tersebut kemudian dianalisis volume biogas dan kadar metana.

3.3.1.6 Isolasi bakteri dari substrat bahan baku kompos dan kotoran sapi

Isolasi bakteri dari substrat bahan baku kompos dan kotoran sapi bertujuan untuk mengetahui jumlah bakteri *indigenous* substrat (bakteri aerob dan anaerob). Sebanyak 10 g bahan baku kompos dan 10 g kotoran sapi masing-masing dimasukkan ke dalam 90 mL akuades steril pada 2 botol kultur yang berbeda. Setelah itu dihomogenkan dengan vortex. Suspensi tersebut kemudian diencerkan hingga pengenceran 10^{-3} untuk bakteri anaerob dan 10^{-8} untuk bakteri aerob. Isolasi bakteri anaerob dilakukan dengan mengambil 3 pengenceran terakhir sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi media NA modifikasi dan ditambahkan dengan 1 mL asam asetat 1 %. Lalu dilakukan dengan metode *pour plate*. Masing-masing cawan Petri tersebut dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* yang disertai dengan anaerogen dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Selanjutnya, untuk isolasi bakteri aerob dilakukan dengan mengambil 3 pengenceran terakhir sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi media NA. Lalu, dilakukan dengan metode *pour plate*. Isolasi bakteri aerob diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Kemudian, untuk mengetahui jumlah koloni dilakukan parameter TPC (*Total Plate Count*).

3.3.1.7 Analisis biogas

Biogas yang tertampung pada kantong plastik diambil, kemudian analisis biogas dilakukan dengan melihat volume biogas dan kadar metana (CH_4) yang terkandung di dalam biogas. Alat yang digunakan untuk pengukuran volume biogas

yaitu volumemeter. Volumemeter ini berbentuk seperti gelas ukur dengan bagian atas tertutup dan terdapat katup untuk menyalurkan biogas. Volumemeter memiliki membran yang sensitif terhadap gas. Prinsip kerja dari volumemeter yaitu biogas yang dialirkan ke dalam alat tersebut menyebabkan kenaikan membran di dalam volumemeter. Kenaikan membran ini akan menunjukkan jumlah volume biogas yang terlihat pada skala volumemeter (a). Kemudian, sampel biogas dalam volumemeter diambil kembali untuk dilanjutkan dengan analisis kadar metana.

Kadar metana diukur menggunakan *gasometer electric*. Prinsip kerja *gasometer electric* dalam analisis biogas yaitu pengukuran selisih massa sampel biogas dalam kantong plastik dengan massa kantong plastik tanpa biogas (b). Lalu massa bahan penyerap gas metana (trietanolamin murni) diukur (c). Sampel gas metana dimasukkan ke dalam *gasometer electric*, lalu gas metana akan terabsorpsi ke dalam absorben (trietanolamin) kemudian membentuk metil-dietanolamin dan air. Hal tersebut menyebabkan cairan absorben mengalami kenaikan massa. Cairan absorben ini kemudian ditimbang menjadi massa absorben akhir (d).

Penghitungan volume biogas dan kadar gas metana dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Volume biogas (mL)} = a$$

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

(Sumber : Balai Penelitian dan Konsultasi Industri, 2014)

3.3.1.8 Analisis rasio C/N

Untuk memperoleh rasio C/N dilakukan pengukuran kadar C-organik dengan metode pengabuan dan analisis N-total dengan metode Gunning. Pengukuran rasio C/N dilakukan hanya satu kali pada tiap perlakuan.

1. Pengukuran Kadar C-organik

Pengukuran kadar C-organik (%) pada sampel perlakuan dilakukan dengan cara berikut. Pertama, menimbang gelas Beaker (a). Kemudian sampel dimasukkan ke dalam gelas Beaker sebanyak 1 g, lalu ditimbang (b). Selanjutnya, gelas Beaker yang berisi sampel dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 4 jam. Sampel dioven bertujuan untuk menghilangkan kadar air di dalam sampel. Setelah itu, sampel didinginkan di dalam desikator (terdapat silika gel) selama ± 5 menit, kemudian ditimbang (c). Desikator adalah wadah untuk mengeringkan suatu spesimen dan menjaganya dari kelembaban udara (Humaidah, 2011). Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam *furnace* dengan suhu 600°C selama 4 jam. Sampel di *furnace* bertujuan untuk membakar sampel hingga membentuk abu (Setiawan dan Prapti, 2009). Kemudian sampel didinginkan kembali ke dalam desikator selama ± 10 menit, dan ditimbang (d).

Keterangan :

- a. Berat gelas Beaker
- b. Berat gelas Beaker + sampel
- c. Berat gelas Beaker + sampel setelah di oven 105°C

d. Berat gelas Beaker + sampel setelah di *furnace* 600°C

Perhitungan :

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

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

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

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

Keterangan : 1,724 = 100/58, faktor konversi bahan organik ke karbon

(Sumber : Sulaiman dan Eviati, 2009)

2. Pengukuran N-Total

Pengukuran N-total dilakukan dengan metode Gunning melalui tiga tahapan, yaitu destruksi, destilasi, dan titrasi. Pada tahap pertama, sebanyak 1 g sampel yang terlebih dahulu ditumbuk halus dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl untuk didestruksi menggunakan 5 g K_2SO_4 yang dicampurkan dengan 10 ml H_2SO_4 pekat, 0,3 g CuSO_4 , dan batu didih. Labu tersebut kemudian dipanaskan dengan api bunsen dalam lemari asam, dan diakhiri setelah cairan menjadi jernih tidak berwarna. Dibuat pula blanko dengan perlakuan yang sama seperti sampel, namun 1 g sampel diganti dengan 1 mL akuades.

Setelah labu Kjeldahl beserta larutan di dalamnya cukup dingin, larutan kemudian dipindahkan ke labu destilasi, dan ditambahkan dengan 100 mL akuades, 1 g Zn, 50 mL NaOH 45 %, dan 3 butir batu didih. Kemudian proses destilasi

dilakukan dengan memanaskan labu Kjeldahl hingga semua amonia menguap, destilat ditampung dalam Erlenmeyer yang berisi 50 mL HCl 0,1 N yang telah diberi indikator *phenolphthalein* 1 % beberapa tetes. Destilasi diakhiri setelah volume destilat tertampung sebanyak ± 75 mL.

Pada tahap titrasi, destilat tersebut dititrasi dengan NaOH 0,1 N. Kadar % N dapat diketahui melalui persamaan berikut :

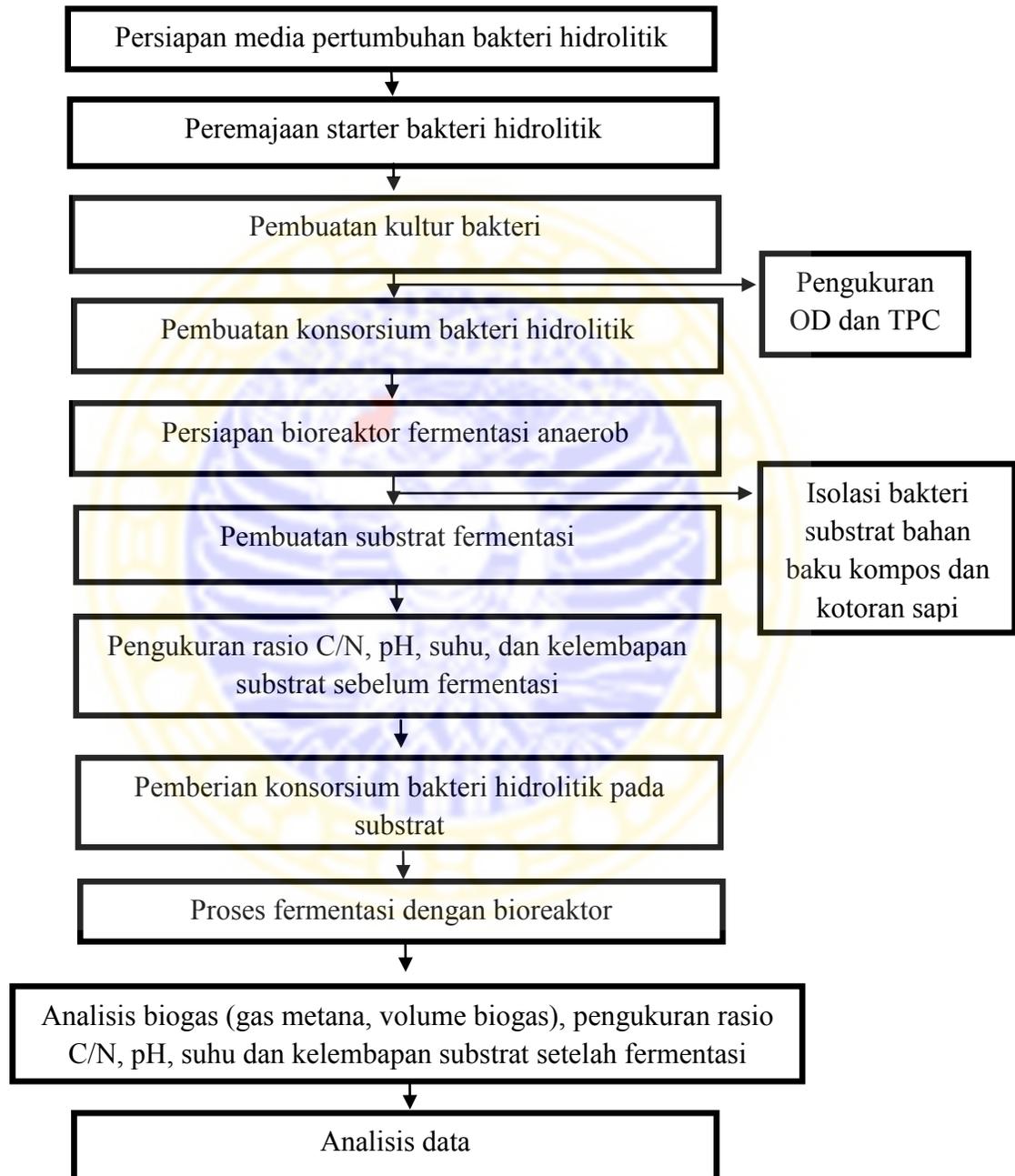
$$\% N = \frac{(\text{mL NaOH blanko} - \text{mL NaOH sampel})}{\text{massa sampel} \times 1000} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times 100 \%$$

Analisis rasio C/N dapat dihitung setelah mendapatkan % kadar C-organik dan total nitrogen. Rasio C/N dihitung menggunakan persamaan berikut :

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

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

3.4 Skema Prosedur Kerja



Gambar 3.3 Skema prosedur kerja

3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan rancangan faktorial 4×4 . Penelitian ini terdiri dari dua faktor. Faktor pertama yaitu variasi konsentrasi konsorsium bakteri hidrolitik yang terdiri dari 4 level yaitu 0 % (K1), 5 % (K2), 10 % (K3), dan 15 % (K4). Konsentrasi 0 % merupakan perlakuan tanpa menggunakan konsorsium bakteri hidrolitik yang digunakan sebagai kontrol. Faktor kedua yaitu variasi waktu fermentasi yang terdiri dari 4 level yaitu 10 hari (W1), 20 hari (W2), 30 hari (W3) dan 40 hari (W4). Pada penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi konsorsium bakteri hidrolitik dan variasi waktu fermentasi bertujuan untuk mengetahui konsentrasi bakteri hidrolitik dan waktu fermentasi yang terbaik dalam memproduksi biogas. Dari kombinasi antara variasi konsentrasi konsorsium bakteri hidrolitik dan variasi waktu fermentasi diperoleh 16 perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan uji pengulangan sebanyak 3 kali. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Rancangan penelitian

Waktu Fermentasi (hari)	Ulangan	Konsentrasi konsorsium bakteri hidrolitik (%)			
		K1	K2	K3	K4
W1	I	W1K1	W1K2	W1K3	W1K4
	II	W1K1	W1K2	W1K3	W1K4
	III	W1K1	W1K2	W1K3	W1K4
W2	I	W2K1	W2K2	W2K3	W2K4
	II	W2K1	W2K2	W2K3	W2K4
	III	W2K1	W2K2	W2K3	W2K4
W3	I	W3K1	W3K2	W3K3	W3K4
	II	W3K1	W3K2	W3K3	W3K4
	III	W3K1	W3K2	W3K3	W3K4
W4	I	W4K1	W4K2	W4K3	W4K4
	II	W4K1	W4K2	W4K3	W4K4
	III	W4K1	W4K2	W4K3	W4K4

Keterangan :

K : konsentrasi konsorsium

K1 : 0 %

K2 : 5 %

K3 : 10 %

K4 : 15 %

W : Hari fermentasi ke-

W1 : hari ke-10

W2 : hari ke-20

W3 : hari ke-30

W4 : hari ke-40

3.6 Variabel Penelitian

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

1. Variabel bebas : konsentrasi konsorsium bakteri hidrolitik (% v/v) dan waktu fermentasi (hari)
2. Variabel terikat : volume biogas (mL), kadar metana (% w/v), dan rasio C/N

3. Variabel terkontrol : volume total substrat (mL), perbandingan bahan baku kompos dengan kotoran sapi sebesar 1:1 (w/w), volume air pada substrat (mL) dan volume media kultur bakteri (mL).

3.7 Analisis Data

Berdasarkan rancangan penelitian yang telah dibuat, maka data yang diperoleh dari perlakuan variasi konsentrasi konsorsium bakteri hidrolitik dan waktu fermentasi adalah data eksperimental yaitu volume biogas (mL) dan kadar metana (% w/v). Selanjutnya data tersebut dianalisis dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Uji yang dilakukan pertama kali yaitu uji kenormalan dengan *One Sample Kolmogorov-Smirnov Test* dan uji homogenitas dengan *Levene Test*.

Jika data berdistribusi normal dan varians data homogen, uji dilanjutkan menggunakan uji Analisis Varians (ANOVA) satu arah dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Apabila ada pengaruh perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *Duncan* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya perbedaan perlakuan.

Jika data berdistribusi normal dan varians data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Brown-Forsythe* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Bila terdapat pengaruh perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *Games-Howell* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya perbedaan perlakuan.

Jika didapatkan data tidak berdistribusi normal dan varians data yang tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Bila terdapat pengaruh perlakuan, dilanjutkan uji *Mann-Whitney* dengan derajat signifikansi 5 % untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan.

Cara pengambilan keputusan dari data uji ANOVA yaitu :

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

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

