

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2023 dan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Sumatera Utara, Jl. Bioteknologi No. 1 Unit 3, FMIPA, Padang Bulan, Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara, 20115 dan Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit BTLKPP Jl. K.H. Wahid Hasyim nomor 15, Merdeka, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara 20153. Pengambilan sampel limbah limbah di UPT TPA Binjai.

#### **3.2 Bahan dan Alat Penelitian**

##### **3.2.1 Bahan-bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah air lindi yang diambil langsung dari UPT TPA Sampah Binjai, media NA, aquadest, buffer fosfat, larutan  $\text{CaCl}_2$ , larutan  $\text{MgSO}_4$ , larutan  $\text{FeCl}_3$ , reagen  $\text{H}_2\text{O}_2$ , media TSIA, kristal violet, lugol, larutan asetan alkohol, larutan safranin. Sedangkan bahan yang digunakan dalam pembuatan Ekoenzim dalam penelitian yaitu: Kulit buah pepaya, gula merah dan air.

##### **3.2.2 Alat-alat Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: Toples, jerigen, erlenmeyer, hotplate, autoklaf, aluminium foil, botol aqua bides, orbital shaker, tabung reaksi, mikropipet, jarum ose, cawan petri, hockey, pipet tetes, botol cell test, alat refluks, spektro meter, beaker glass, aerator, botol winkler, objek glass, mikroskop, spirtus, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pipet tetes.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Metode yang digunakan pada penelitian ini berupa metode kuantitatif, yang terdiri dari kontrol dan pemberian ekoenzim 10% dengan 3 kali pengulangan pada

setiap perlakuan. Pengamatan dilakukan pada hari ke 0 dan hari ke 10, untuk pengujian nilai BOD dan COD dilakukan di Balai Teknik Kesehatan Lingkungan Dan Pengendalian Penyakit (BTKLPP) Medan.

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Penentuan Lokasi**

Pengambilan sampel ditentukan dengan mengidentifikasi faktor-faktor spesifik yang relevan dengan tujuan penelitian dengan cara yang diharapkan dapat menjawab pertanyaan penelitian. Salah satu ciri khusus yang perlu diperhatikan adalah TPA (Tempat Pembuangan Akhir), yang memiliki tempat pembuangan sampah tempat bahan organik hasil pembusukan dilarutkan.

#### **3.4.2 Pengambilan Sampel**

Penelitian ini menggunakan sampel limbah air lindi yang diambil sebanyak 4 liter dengan menggunakan jerigen (5000 ml) yang berasal dari UPT TPA Sampah Binjai di kota Binjai, Sumatera Utara.

#### **3.4.3 Pembuatan Ekoenzim**

Dituangkan 500 ml air bersih ke dalam toples. Kemudian tambahkan 150 gram kulit pepaya dan 50 gram gula merah. Sehingga perbandingan air : kulit pepaya : gula merah = 10 : 3 : 1. Perhatikan semua bahan yang dimasukkan ke dalam toples, agar tidak memenuhi seluruh volume toples, diperlukan ruang untuk fermentasi. Lalu aduk hingga gula larut dalam air hingga rata. Setelah semua bahan tercampur rata, tutup toples untuk mencegah masuknya udara luar yang dapat mengganggu proses fermentasi (bisa juga menggunakan karet atau plastik yang diikat dengan tali rafia untuk menutupnya) dan tutup dengan penutup. Ekoenzim yang dihasilkan kemudian disimpan jauh dari jangkauan sinar matahari, dan fermentasi membutuhkan waktu 3 bulan untuk menyelesaikannya. Selama minggu pertama persiapan, tutupnya boleh dibuka dua kali (wadah/botol kecil) selama beberapa detik untuk mengeluarkan gas yang dihasilkan. Setelah 3 bulan penyimpanan, saring residunya dan ambil airnya.

### 3.4.4 Pengaplikasian Limbah Air Lindi Menggunakan Ekoenzim

Dilakukan pengenceran ekoenzim kulit buah pepaya dengan aquades dengan perbandingan 1:6, sebanyak ekoenzim 300 ml dan aquades 3000 ml. Kemudian siapkan 12 botol aquades, selanjutnya siapkan 6 botol aquades untuk diberi perlakuan ekoenzim dengan campuran hasil pengenceran ekoenzim sebanyak 30 ml dan limbah air lindi sebanyak 300 ml, dan 6 botol aquades sebagai kontrol dengan limbah air lindi sebanyak 300 ml. Lalu diberi tanda menggunakan kertas label untuk penentuan hari ke-0 dan hari ke-10, untuk hari ke-10 botol aquades diletakkan di alat orbital shaker.

### 3.4.5 Pengujian BOD dan COD

#### 1. Uji BOD

Diambil masing-masing sebagian sampel lalu di letakkan di beaker glass untuk diukur DO segera. Siapkan air pengenceran, dimana untuk setiap liter air suling ditambahkan 1 ml buffer fosfat, 1 ml larutan  $\text{CaCl}_2$ , 1 ml larutan  $\text{MgSO}_4$ , 1 ml  $\text{FeCl}_3$  dan di aerator selama 30 menit. Sampel yang telah diencerkan kemudian dipindahkan ke dalam 2 botol Winkler 300 ml, 1 labu diinkubasi selama 5 hari pada suhu  $20^\circ\text{C}$  dan 1 labu selama 0 hari untuk pengukuran DO. Selanjutnya sampel yang sudah diencerkan akan hitung  $\text{DO}_{(0)}$  dan  $\text{DO}_{(5)}$  untuk dimasukkan kedalam rumus BOD. Lakukan hal yang untuk pengujian BOD hari ke-10.

Rumus BOD:

$$\text{Koreksi volume pengencer} = \frac{300-30}{300} = 0,9$$

Maka :  $\text{BOD larutan pengencer}_{(5)} = (b-d) \times \text{Koreksi volume pengencer}$

$$\text{BOD sampel}_{(5)} = (a-c) - \text{BOD larutan pengencer}_{(5)} \times \text{faktor pengencer}$$

Keterangan :

- DO sampel<sub>(0)</sub> = a mg/L
- DO larutan pengencer<sub>(0)</sub> = b mg/L
- DO sampel<sub>(5)</sub> = c mg/L
- DO larutan pengencer<sub>(5)</sub> = d mg/L

## 2. Uji COD

Masing-masing sampel diambil sebanyak 3 ml dengan alat pipet tetes kedalam botol cell test yang berisikan reagen. Kemudian di homogenkan lalu diletakkan ke alat refluks dengan suhu 150<sup>0</sup> selama 2 jam, setelah itu di dinginkan dengan suhu ruang dan di ukur dengan spektro meter. Pengujian dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-10.

### 3.4.6 Angka Kuman

#### 1. Pembuatan Media

Ditimbang media NA sebanyak 2,8 gr, kemudian dimasukkan kedalam erlen dan dikasih aquadest sebanyak 100 ml, kemudian dipanaskan di atas hotplate hingga homogen.

#### 2. Isolasi Bakteri

Disiapkan 6 tabung reaksi yang berisikan cairan aquades, lalu diambil sampel limbah air lindi yang sudah ditambahkan pengenceran ekoenzim menggunakan mikropipet sebanyak 1000 mikrolit, lalu tuang ke dalam tabung reaksi yang berisikan aquadest dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali. Kemudian di tabung reaksi akhir diambil sampel menggunakan mikropipet 100 mikrolit dan diletakkan di cawan petri yang berisikan PCA. Lalu diolesi dengan hockey stick dengan metode cawan sebar, lakukan hal sama untuk kontrol. Kemudian di inkubasi selama 24 jam untuk hasil pengamatan.

#### 3. Pengujian Makroskopis

Diambil sebagian koloni bakteri dengan menggunakan ose yang sudah steril, lalu di oleskan secara menyeluruh ke media agar yang

sudah disiapkan. Kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk mengetahui bentuk agarnya.

#### 4. Pengujian Bakteri

- Uji Katalase

Bakteri diambil menggunakan ose steril pada media koleksi, lalu di letakkan pada permukaan objek glass steril dan ditetesi reagen hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ).

- Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Pada media biakan bakteri, digoreskan biakan dengan menggunakan ose steril. Lalu pada media TSIA yang sudah disediakan, ditusuk dengan ose sampai sepertiga dasar tabung, kemudian diangkat setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Lakukan hal yang sama dengan media biakan bakteri lainnya.

- Uji Biokimia

Media uji biokimia yang digunakan yaitu SIM, SC, MRVP. Pada media biakan bakteri, digoreskan biakan dengan menggunakan ose steril. Lalu pada media biokimia yang sudah disediakan, ditusuk dengan ose sampai sepertiga dasar tabung, kemudian diangkat setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Lakukan hal yang sama dengan media biakan bakteri lainnya.

- Pewarnaan Gram

Bakteri diambil menggunakan ose steril pada media yang berisikan koleksi, lalu letakan diatas cawan petri. Kemudian tuangkan larutan zat warna kristal violet, biarkan selama 1 menit dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian tuangkan larutan lugol, biarkan selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir.

Kemudian tuangkan larutan asetan alkohol, biarkan selama 15 detik dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian tuangkan larutan safranin, biarkan selama 1 menit dan dibilas dengan air mengalir. Lalu keringkan dengan tisu dan periksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x (pakai minyak imersi)

## **5. Pengujian Makroskopis**

Pada hasil pewarnaan gram, masing-masing cawan petri di periksa dengan mikroskop dengan perbesaran 1000x.

### **3.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik untuk mengetahui apakah kadar BOD dan COD air limbah berbeda nyata dengan atau tanpa penggunaan ekoenzim kulit pepaya. Analisis statistik yang digunakan adalah SPSS ANOVA (Analysis of Variance). Salah satu cara untuk melihat pengaruh konsentrasi ekoenzim pada kulit pepaya terhadap nilai BOD dan COD air limbah.