

BAB III

PROSEDUR PENELITIAN

1.1. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode *true experimental research* atau metode eksperimen. Adapun yang menjadi fitur penting dari penelitian eksperimental adalah bahwa para peneliti dengan sengaja mengontrol dan memanipulasi kondisi yang menentukan peristiwa yang mereka minati, memperkenalkan intervensi dan mengukur perbedaan yang dihasilkannya (Cohen, Manion, & Morrison, 2018). Sehingga metode yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen.

1.2. Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat dua variabel yang diteliti, yaitu :

1) Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsorsium bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

2) Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah dekolorisasi pewarna sintetik yang terdapat pada limbah cair batik.

1.3. Populasi dan Sampel

1.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah limbah cair batik yang dihasilkan oleh 19 UMKM batik di kawasan sentra batik kota Tasikmalaya sebagai berikut:

Tabel 3.1
Data UMKM Batik di Kawasan Sentra Batik Kota Tasikmalaya

No	Nama Perusahaan UMKM	Nama Pemilik	Alamat
1.	Nagariharja	Hj. Tien Kartini	Kampung Cicariu, RT/RW 04/09
2.	Nanda	Ade	Kampung Cicariu, RT/RW 05/09
3.	Nizar	Ujang Kirom	Kampung Cicariu, RT/RW 05/09
4.	Rizky	Yuyun	Kampung Cicariu, RT/RW 05/09
5.	W.D.	Wati	Kampung Ciroyom, RT/RW 03/10
6.	Tedi	Uju	Kampung Ciroyom, RT/RW 03/10
7.	Puteri Kembar	Yoyo	Kampung Ciroyom, RT/RW 04/10

8.	Denok	Hj. Yoyoh	Kampung Ciroyom, RT/RW 01/10
9.	Yayat	Hj. Ani Sumarni	Kampung Ciroyom, RT/RW 04/10
10.	Elang Mas	Didi	Kampung Ciroyom, RT/RW 01/10
11.	Agnesa Putra	H. Asep	Kampung Ciroyom, RT/RW 02/10
12.	Agnesa	H. Cacu	Kampung Ciroyom, RT/RW 03/10
13.	Rafsanjani	Gani	Kampung Ciroyom, RT/RW 03/10
14.	Sopiah	Sopiah	Kampung Ciroyom, RT/RW 03/10
15.	Mekar Jaya	Tedi	Kampung Ciroyom, RT/RW 06/10
16.	Sumber Sari	Maman Tarliman	Kampung Cigeureung, RT/RW /11
17.	Deden	H.Deden	Kampung Cicariu, RT/RW 04/09
18.	Putera	Ace	Kampung Ciroyom, RT/RW 03/10
19.	Sukapura	Encu Samsu	Kampung Cigeureung, RT/RW 03/11

Sumber: (Kasi Ekbang Kelurahan Nagarasari, Dinas Lingkungan Hidup Kota Tasikmalaya, 2020)

1.3.2. Sampel

Sampel dalam penelitian berupa suatu kelompok tertentu yang didalamnya dapat diperoleh suatu informasi yang ingin didapatkan (Cohen et al., 2018). Sampel yang akan digunakan dalam penelitian adalah limbah cair batik berasal dari salah satu UMKM berskala menengah yang menggunakan pewarna azo dan belum memiliki saluran IPAL (Instalasi Pengolahan Air Limbah) yaitu UMKM batik Sukapura (Kampung Cigeureng) yang mana pemiliknya menyebutkan lebih banyak menggunakan pewarna reaktif *Procion Red* saat produksi batik. Sampel akan diambil dari kolam pewarnaan dan pembilasan kain batik sebelum tercampur dengan perairan sungai. Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik *purposive sampling*. Alasan menggunakan teknik tersebut dikarenakan populasi antar kelas dianggap bersifat homogen, jumlah populasi banyak dan luas, UMKM batik berskala *home industry* yang belum mempunyai saluran IPAL, serta proses produksi dan penjualan berada di satu tempat yang sama.

1.4. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) dimana keempat perlakuan termasuk kontrol dikenakan pada sampel limbah cair batik Sukapura konsentrasi 75% yang mana menurut pemiliknya mengandung pewarna reaktif *Procion Red* yang tergolong

pewarna monoazo serta dilakukan pengukuran data rasio berupa absorbansi zat warna menggunakan metode spektrofotometri serta pH dan kadar BOD. Dalam pengukuran efektivitas dekolorisasi dan parameter pendukungnya (pH) menggunakan 4 perlakuan yang disertai kontrol (t) sehingga dibutuhkan ulangan sebanyak 6 kali dengan perhitungan sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$(3)(r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 5$$

$$r \geq 6$$

Pada percobaan ini digunakan 24 plot percobaan dengan pola 6 x 4 (r x t). Sampel penelitian ditempatkan pada plot percobaan secara random. Tiap cawan petri diberikan label yang menunjukkan perlakuan. Tiap plot percobaan menunjukkan persentase dekolorisasi limbah cair batik.

Tabel 3.2

Desain Penelitian RAL (Rancangan Acak Lengkap) pada Limbah Cair Batik yang mengandung Pewarna reaktif *Procion Red*

U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆
P ₃	P ₄	P ₃	P ₁	P ₄	P ₂
P ₁	P ₂	P ₄	P ₄	P ₂	P ₃
P ₂	P ₁	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
P ₄	P ₃	P ₂	P ₃	P ₁	P ₁

Keterangan :

U₁ = Ulangan ke-1

U₂ = Ulangan ke-2

U₃ = Ulangan ke-3

U₄ = Ulangan ke-4

U₅ = Ulangan ke-5

U₆ = Ulangan ke-6

P₁ = Konsorsium *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 0 hari (Kontrol)

P₂ = Konsorsium *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 1 hari

P₃ = Konsorsium *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 2 hari

P₄ = Konsorsium *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 3 hari

1.5. Langkah-langkah Penelitian

Secara umum, langkah-langkah penelitian terdiri dari tiga tahapan, yakni:

1.5.1. Tahap Persiapan

- a) Mendapatkan informasi dari tim Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) jurusan Pendidikan Biologi tentang Pembimbing dan Penyusunan Proposal Penelitian Program Studi Pendidikan Biologi
- b) Mendapatkan Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Siliwangi mengenai penetapan bimbingan skripsi pada tanggal 25 November 2020
- c) Mengonsultasikan judul dan permasalahan yang akan diteliti dengan pembimbing I dan II.
- d) Mengajukan judul ke Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) pada tanggal 26 Desember 2020.
- e) Menyusun proposal penelitian yang dibimbing oleh dosen pembimbing I dan II.
- f) Membuat surat rekomendasi penelitian dari Dekan FKIP Universitas Siliwangi dan kesbangpol Kota Tasikmalaya yang bertujuan memperoleh data primer dan sekunder terkait UMKM batik dan sistem IPAL pada Dinas Lingkungan Hidup Kota Tasikmalaya dan Kelurahan Nagarasari yang tertera pada lampiran 1.
- g) Melakukan survei dan studi pendahuluan di dinas Lingkungan Hidup dan Kawasan Sentra Batik Kota Tasikmalaya untuk memperoleh informasi terkait data industri batik, sistem IPAL di kawasan sentra batik Kota Tasikmalaya, dan pewarna yang banyak digunakan oleh beberapa industri di kawasan tersebut.
- h) Mengajukan permohonan pelaksanaan seminar proposal penelitian kepada Dewan Bimbingan Skripsi (DBS).

- i) Melaksanakan seminar proposal penelitian pada tanggal 25 Mei 2021, sehingga memperoleh saran, tanggapan, koreksi, dan perbaikan proposal penelitian.



Gambar 3.1

Seminar Proposal Penelitian

Sumber : Dokumentasi Pribadi

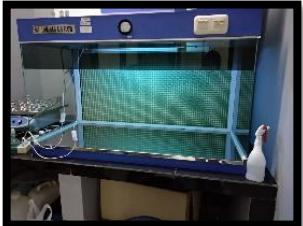
- j) Merevisi proposal penelitian dan mengkonsultasikannya kepada dosen pembimbing I dan II. Lalu mengirimkan revisi proposal penelitian dan tanda tangan rekomendasi ujian seminar hasil penelitian pada dosen penguji 1, 2, dan 3 beserta dosen pembimbing I dan II.
- k) Mengurus perizinan untuk mulai melaksanakan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi, FKIP, Universitas Siliwangi pada tanggal 28 Januari 2022
- l) Melakukan penelitian di laboratorium Mikrobiologi dan Botani Universitas Siliwangi pada tanggal 02 Februari 2022 sampai dengan 07 April 2022 dan dilakukan di Laboratorium Dinas Lingkungan Hidup Soreang Kabupaten Bandung pada tanggal 07 April sampai dengan 10 Mei 2022.

1.5.2. Tahap Pelaksanaan

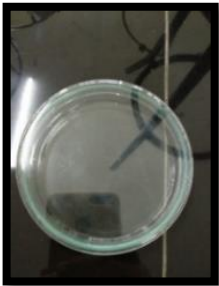
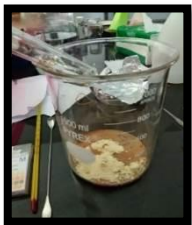
1) Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3.3
Alat dan Bahan Penelitian

No	Alat & Bahan	Merek dan Kegunaan	Jumlah	Gambar
1.	Inkubator	<i>Memmert</i> , Menumbuhkan kultur mikroba	1 buah	
2.	Autoklaf	<i>Autoclave electric All America 50x</i> , Sterilisasi alat dan bahan	1 buah	
3.	<i>Thermoshaker incubator</i>	<i>Gerhardt 500</i> , Menghomogenkan sampel pada media MSMB dan inkubasi sampel penelitian	1 buah	
4.	LAF (<i>Laminar Air Flow</i>)	<i>Robust</i> , Melakukan kegiatan inokulasi dan kultur murni bakteri	1 buah	
5.	<i>HACH visible spectrophotometer</i>	<i>DR 3900</i> , alat spektrofotometer yang mengukur absorbansi sampel menggunakan supernatan sampel pada panjang gelombang 320 – 1100 nm	1 buah	

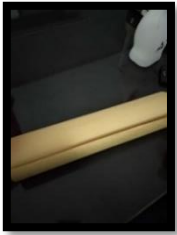
6.	<i>Vortex mixer</i>	<i>Maxqu 2508,</i> Menghomogenkan sampel saat pengukuran BOD	1 buah	
7.	Kompor	<i>Hi-cook,</i> Menghomogenkan larutan dengan pengadukan dalam pembuatan media dan pengukuran BOD.	1 buah	
8.	<i>Centrifuge</i>	<i>Model DBS,</i> Memisahkan absorbansi supernatan pada sampel untuk pembuatan suspensi mikroba	1 buah	
9.	Timbangan Analitik	<i>Kenko Analitic High Precicison,</i> Menimbang bahan dasar dalam pembuatan media dan larutan standar	1 buah	

10.	Cawan petri	<i>Anumbra</i> , Menumbuhkan kultur mikroba, adaptasi mikroba terhadap limbah, serta penyimpanan sampel yang akan dilakukan uji dekolorisasi	8 buah	
11.	Gelas beaker 1000 mL	<i>Pyrex</i> , Untuk menghomogenkan media MSMB (<i>Mineral Salt Medium Broth</i>) atau MSM cair dan penyimpanan larutan standar kadar BOD	4 buah	
12.	Gelas beaker 100 mL	<i>Pyrex</i> , Untuk penyimpanan larutan NaOH 30% pengukuran kadar BOD, pengenceran limbah untuk MSMB dan kadar BOD, penyimpanan larutan buffer	5 buah	
13.	Gelas beaker 500 mL	<i>Pyrex</i> , Untuk penyimpanan larutan pengencer pengukuran kadar BOD	4 buah	
14.	Gelas beaker 200 ml dan 250 mL	<i>Duran</i> , wadah indikator amilum pengukuran BOD, MnSO_4 , dan indikator amilum	3 buah	
15.	Erlenmeyer 500 ml	<i>Pyrex</i> , Untuk penyimpanan media NA, LB, dan MSMB serta penyimpanan stock media dan kadar BOD	6 buah	

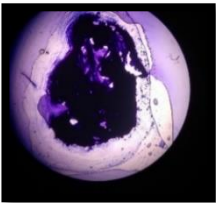
16.	Gelas ukur 100 mL	<i>Pyrex</i> , Mengukur volume sampel limbah dalam pembuatan MSMB dan pengukuran kadar BOD	4 buah	
17.	Spatula	Lokal, Untuk mengambil bahan dasar dalam pembuatan larutan standar BOD dan uji dekolonisasi	3 buah	
18.	Jarum ose	Lokal, Menginokulasikan mikroba pada media	2 buah	
19.	Tabung reaksi	<i>Iwaki</i> , Penyimpanan kultur bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> beserta pengukuran dekolonisasi dan suspensi mikroba (kadar BOD)	39 buah	
20.	Botol winkler	<i>Duran</i> , berukuran 100 mL, Penyimpanan sampel yang akan diukur absorbansi warnanya	24 buah	
21.	Rak tabung reaksi	Lokal, Menyimpan tabung reaksi yang berisi sampel perlakuan dan media LB	4 buah (2 rak : 24 sampel dan 2 rak : 4 NA miring 6 LB)	

22.	Pipet tetes 10 mL	<i>ONEMED</i> , Memindahkan cairan dalam jumlah kecil	3 buah	
23.	Tip Mikropipet	<i>ONEMED</i> , Memindahkan cairan dalam jumlah kecil dan ketelitian mulai 0,1-1 mL (100 – 1000 µL)	4 buah	
24.	Mikropipet	<i>Boeco</i> , Memindahkan cairan dalam jumlah kecil dan ketelitian mulai 0,1-1 mL (100 – 1000 µL)	1 buah	
25.	Botol gelap ukuran 250 mL	<i>Nurra Gemilang Lab</i> , Tempat penyimpanan sampel limbah cair batik	2 buah	
26.	Termometer batang	<i>OEM</i> , Mengukur suhu limbah di lapangan dan laboratorium mikrobiologi	1 buah	
27.	DO meter	<i>Lutron Wa-2017SD</i> , Menghitung DO (<i>Dissolved Oxygen</i>) dalam pengukuran BOD	1 buah	

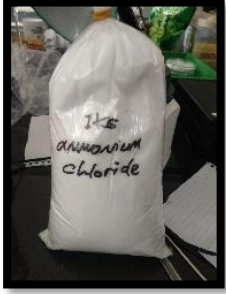
28.	Pinset	Lokal, Untuk memindahkan <i>magnet</i> saat pembuatan media	3 buah (media NA, LB dan MSMB)	
29.	Batang pengaduk	<i>Pyrex</i> , Mengaduk cairan dalam gelas kimia	3 buah	
30.	Botol Winkler 500 mL	<i>Duran</i> , Menghomogenkan sampel saat pengukuran kadar BOD	8 buah (A ₁ , A ₂ , B ₁ , dan B ₂ pada kontrol dan perlakuan)	
31.	Bunsen	Lokal, Untuk sterilisasi jarum inokulum atau ose saat inokulasi mikroba ke media	1 buah	
32.	<i>Alumunium Foil</i>	<i>Total Wrap</i> , Melapisi alat dan bahan	1 buah	
33.	Plastik <i>Wrapping</i>	<i>Wrapping Cling</i> , Melapisi <i>alumunium foil</i>	1 buah	

34.	Kertas Cokelat	<i>Samson</i> , Melapisi alat ketika akan disterilisasi	1 buah	
35.	Kertas Label	<i>Fox</i> , Memberi nama setiap perlakuan pada tabung reaksi	1 bungkus	
36.	Karet	<i>Super</i> , Mengikat <i>aluminium foil</i> pada saat sterilisasi alat dan bahan	60 buah atau secukupnya	
37.	Corong kaca	<i>Pyrex</i> , Mengambil limbah	2 buah	
38.	Sarung Tangan	<i>Safe Glow Latex</i> , Untuk menjaga kesterilan saat kultur bakteri	secukupnya	
39.	Selotip	<i>Yard</i> , Untuk merekatkan kertas payung sebelum sterilisasi dengan autoklaf	secukupnya	

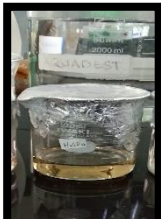
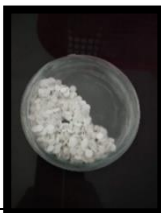
40.	Plastik Tahan Panas	<i>Bell</i> , Untuk menyimpan alat yang akan disterilisasi	secukupnya	
41.	Tisu	<i>Paseo</i> , Untuk mensterilkan meja laboratorium dan sterilisasi alat	secukupnya	
42.	Gas gasoline	<i>Gas Wonder Fuel LPG (Liquied Butane)</i> , Untuk bahan bakar saat memanaskan media	2 buah	
43.	Kertas Saring <i>Whattman</i>	<i>Whattman Filter Nomor 42</i> , Menyaring mikroorganisme dan serasah saat pengambilan limbah	2 buah	
44.	Jangka Sorong	<i>Triple China Vernier Caliper</i> , Mengukur zona bening pada uji difusi cakram (aktivitas dekolorisasi pada limbah)	1 buah	
45.	Lampu meja	<i>ATN</i> , Mengamati pertumbuhan bakteri di media NA, NA miring, dan LB serta zona bening pada uji difusi cakram (aktivitas dekolorisasi pada limbah)	1 buah	
Kultur Bakteri				

46.	Isolat <i>Bacillus subtilis</i>	Bakteri gram positif yang diujicobakan dalam mengukur efisiensi dekolorisasi, kadar BOD, dan derajat keasaman (pH)	1 tabung	 
47.	Isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bakteri gram negatif yang diujicobakan dalam pengembangan konsorsium serta mengukur efisiensi dekolorisasi, kadar BOD, dan derajat keasaman (pH)	1 tabung	 
Pembuatan Bahan Media				
48.	Media NA dan NA miring (Bubuk NA)	Oxoid, Tempat peremajaan koloni bakteri dan pengujian sampel limbah	7,02 gram + 7,02 gram	
49.	Media LB (Bubuk LB)	Oxoid, Tempat isolasi mikroba	3,26 gram	

50.	Limbah cair batik murni dan konsentrasi 75%	Mengandung pewarna reaktif <i>Procion Red</i> , Pembuatan media MSMB dan pengukuran kadar BOD	10 mL dan 100 mL	
51.	KH_2PO_4 (Kalium Dihidrogen Fosfat)	<i>Bratachem</i> , Bahan dasar pembuatan MSMB (<i>Mineral Salt Medium Broth</i>)	1 gram x 2 = 2 gram	
52.	MgSO_4 (Magnesium Sulfat)	<i>Bratachem</i> , Bahan dasar pembuatan MSMB (<i>Mineral Salt Medium Broth</i>)	0,2 gram x 2 = 0,4 gram	
53.	FeSO_4 (Besi Sulfat)	<i>Merck</i> , Bahan dasar pembuatan MSMB (<i>Mineral Salt Medium Broth</i>)	0,01 gram x 2 = 0,02 gram	
54.	NB (<i>Nutrient Broth</i>)	<i>Oxoid</i> , Bahan dasar pembuatan MSMB (<i>Mineral Salt Medium Broth</i>)	15 gram x 2 = 30 gram	

55.	NH_4Cl (Amonium Klorida)	Merck, Bahan dasar pembuatan MSMB (<i>Mineral Salt Medium Broth</i>)	4 gram x 2 = 8 gram	
56.	NaCl (Natrium Klorida)	Merck, Bahan dasar pembuatan MSMB (<i>Mineral Salt Medium Broth</i>)	0,1 gram x 2 = 0,2 gram	
57.	Glukosa	Lokal, Nutrisi mikroba pada media MSMB	0,05 gram x 2 = 0,1 gram	
Pengukuran Derajat Keasaman (pH)				
58.	Pengukur pH universal	Merck, Mengukur pH media	26 buah	
Pengukuran Kadar BOD				
59.	KH_2PO_4 (Kalium Dihidrogen Fosfat)	Bratachem, Bahan Larutan <i>Buffer</i> Fosfat	21,25 gram	

60.	NH_4Cl (Amonium Klorida)	Merck, Bahan Larutan <i>Buffer</i> Fosfat	0,85 gram	
61.	NaOH (Natrium Hidroksida)	Merck, Bahan Larutan <i>Buffer</i> Fosfat dan Bahan Larutan Basa 1 N	30 gram dan 1 N (1-2 tetes)	
62.	MgSO_4 (Magnesium Sulfat)	Bratachem, Bahan Larutan Nutrisi (Magnesium Sulfat) dan Larutan Pengencer	5,625 gram	
63.	CaCl_2 (Kalsium Klorida)	Merck, Bahan Larutan Nutrisi (Kalsium Klorida) dan Larutan Pengencer	6,875 gram	
64.	FeCl_3 (besi Triklorida)	Merck, Bahan Larutan Nutrisi (Besi Triklorida) dan Larutan Pengencer	0,0625 gram	
65.	MnSO_4 (Mangan Sulfat)	Merck, Bahan Larutan pengujian kadar BOD	20 gram	

66.	H ₂ SO ₄ (Asam Sulfat)	Merck, Bahan Larutan Asam 1 N	10 mL	
67.	KI (Kalium Iodida)	Merck, Bahan Larutan Kalium Iodida 10%	10 gram	
68.	Kanji	Kiloan, Bahan Larutan Indikator Amilum	2 gram	
69.	Asam salisilat	Merck, Bahan Larutan Indikator Amilum	0,2 gram	
70.	Akuademin (air demin)	Pafecta, Bahan pengencer larutan pengujian BOD	6000 mL (6 L)	
Pengujian Dekolorisasi				
71.	Paper disc	Velcro, Menguji ada tidaknya aktivitas dekolourisasi pada sampel limbah (uji difusi cakram)	12 lembar	
72.	Alkohol 70%-96%	Lokal, Sterilisasi alat dan meja laboratorium	Secukupnya	

73.	Akuades	Pembuatan media dan pengukuran BOD	Secukupnya	
-----	---------	------------------------------------	------------	---

2) Prosedur Penelitian

a) Sterilisasi Alat dan Bahan

Setelah dipreparasi, alat dan bahan harus disterilisasi agar terhindar dari mikroorganisme sehingga nantinya tidak menghambat pertumbuhan mikroba. Adapun tahapan sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut:

- (1) Cuci alat menggunakan air keran yang bersih dan gunakan sabun. Gosok menggunakan spons (wadah gelas *beaker*) atau penggosok (wadah yang berlubang kecil). Lalu keringkan dengan tisu dan diamkan sebentar.
- (2) Semprot menggunakan alkohol 96% secara merata ke permukaan alat. Lalu keringkan dengan tisu lap hingga kering dan bersih. Diamkan sebentar hingga kering.
- (3) Tutupi permukaan lubang wadah seperti erlenmeyer dan gelas *beaker* menggunakan *aluminium foil* dengan rapat, sementara sisanya bungkus dengan kertas cokelat dengan ketentuan tabung reaksi 2-5 buah, *beaker glass* 100 mL 4 buah, tabung reaksi 10 mL 4 buah, serta jarum ose, batang pengaduk dan pinset disatukan.
- (4) Alat yang dibungkus tempelkan dengan selotip. Lalu masukkan seluruh alat dan bahan pada plastik tahan panas dan mengikatnya dengan karet kuning.
- (5) Masukkan pada panci autoklaf dan tutup autoklaf dengan rapat. Nyalakan autoklaf elektrik dan sterilisasi selama 2 jam pada suhu 121°C tekanan 1 atm.
- (6) Mengeluarkan alat dan bahan yang telah disterilkan. Serta ditiriskan di meja laboratorium sampai uap airnya turun. Lalu masukkan alat dan bahan pada lemari penyimpanan alat bahan.

Tahapan sterilisasi alat laboratorium dapat diamati pada gambar 3.2 sebagai berikut.



(A)



(B)



(C)



(D)

Gambar 3.2

(A) Mencuci alat, (B) Membungkus alat, (C) Proses Sterilisasi, dan (D) Meniriskan alat yang telah disterilisasi

Sumber: Dokumentasi Pribadi

b) Survei dan Pengambilan Sampel Limbah

Metode pengambilan sampel air limbah mengacu pada SNI 6989.59:2008: tentang metode pengambilan contoh air limbah. Sampel air limbah batik diambil dari satu lokasi industri batik yang berada di kawasan sentra batik Kota Tasikmalaya, Kelurahan Nagarasari, Kecamatan Cipedes, Kota Tasikmalaya yang ditentukan oleh jenis pewarna azo yang digunakan, yaitu di UMKM batik Sukapura (Kampung Cigeureung) dengan pemilik Bapak Encu Samsu menggunakan pewarna reaktif *Procion Red*. Pertama dilakukan pengukuran pH

dan suhu limbah menggunakan pH universal dan termometer batang yang diperoleh hasil pengukuran pH 3 dan suhu 18°C. Lalu disaring dengan kertas filter *Whattman* nomor 42 selama dua kali pada botol gelap dan dimasukkan ke dalam lemari kulkas laboratorium pada suhu 4°C. Untuk pembuatan media MSMB dan pengukuran kadar BOD dibuat konsentrasi limbah 75% dengan cara mengencerkan 7,5 mL limbah pada 10 mL gelas ukur dengan akuades.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

Gambar 3.3

(A) Pengukuran suhu limbah, (B) Pengukuran pH limbah, (C) Menyaring sampel limbah selama dua kali di wadah yang berbeda, (D) Sampel yang telah disaring dimasukkan pada botol gelap, dan (E) Sampel dimasukkan ke dalam kulkas laboratorium

Sumber : Dokumentasi Pribadi

c) Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Bertujuan sebagai media kultur peremajaan tiap isolat murni, pengembangan konsorsium sebelum ditambahkan pada media MSMB limbah batik 75% yang berupa pengukuran absorbansi warna.

(1) Media NA (*Nutrient Agar*)

Sejumlah tahapan pembuatan media NA sebagai berikut:

- (a) Timbang media NA 7,02 gram pada timbangan analitik
- (b) Masukkan pada gelas beaker 1000 mL dan tuangkan akuades steril sebanyak 250 mL
- (c) Nyalakan kompor yang telah diisikan gas *gasoline butana* dan letakkan gelas beaker yang berisi bubuk NA dan akuades di atas kompor.
- (d) Homogenkan media dengan cara mengaduknya selama ± 30 menit sampai homogen dan mendidih dengan suhu $\pm 80^\circ\text{C}$
- (e) Matikan kompor dan pindahkan media NA pada labu erlenmeyer 500 mL.
- (f) Sterilisasi media pada *autoclave* elektrik selama $\pm 1,5$ jam pada suhu 121°C dan tekanan 0.15 Mpa.
- (g) Keluarkan media dari *autoclave* dan masukkan media NA pada kulkas laboratorium.

(2) Media LB (*Luria Bertani/Lactose Broth*)

Sejumlah tahapan pembuatan media LB sebagai berikut:

- (a) Timbang media bubuk LB 3,26 gram pada timbangan analitik
- (b) Masukkan pada gelas beaker 1000 mL dan tuangkan akuades steril sebanyak 250 mL
- (c) Nyalakan kompor yang telah diisikan gas *gasoline butana* dan letakkan gelas beaker yang berisi bubuk LB dan akuades di atas kompor.
- (d) Homogenkan media dengan cara mengaduknya selama ± 30 menit sampai homogen dan mendidih dengan suhu $\pm 80^\circ\text{C}$
- (e) Matikan kompor dan pindahkan media LB pada labu erlenmeyer 500 mL.
- (f) Sterilisasi media pada *autoclave* elektrik selama $\pm 1,5$ jam pada suhu 121°C dan tekanan 0.15 Mpa.

(g) Keluarkan media dari *autoclave* dan masukkan media LB pada kulkas laboratorium.

Proses pembuatan media NA dan LB dapat dilihat pada gambar gambar 3.4 sebagai berikut.



(A)



(B)



(C)



(D)

Gambar 3.4

(A) Penimbangan bahan media NA, (B) mengaduk larutan NA agar homogen, (C) menyiapkan media NA sebelum disterilisasi, serta (D) sterilisasi media NA

Sumber: Dokumentasi Pribadi

(3) Media MSMB (*Mineral Salt Medium Broth*)

Sejumlah tahapan pembuatan media MSMB sebagai berikut:

- (a) Timbang bahan yang diperlukan dalam pembuatan MSMB yaitu 1,8 gram K_2HPO_4 ; 4,0 gram NH_4Cl ; 0,2 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 gram $NaCl$; 0,01 gram $FeSO_4$; serta 15 gram NB dan glukosa 0,05 gram pada timbangan analitik (Mukred, Hamid, Hamzah, & Yusoff, 2008);
- (b) Tuangkan akuades steril 1 L dan air limbah batik (konsentrasi limbah 75% dengan menuangkan 7,5 mL limbah batik dan 2,5 mL akuades) pada gelas beaker 1000 mL;
- (c) Campurkan seluruh bahan yang telah ditimbang dengan akuades steril, lalu disesuaikan pH larutan menjadi 6,9 atau pH mendekati sampel limbah. Jika terlalu alkali tambahkan HCl 1N, tetapi jika terlalu asam tambahkan NaOH 1N. Lalu pindahkan pada labu erlenmeyer 500 mL sebanyak dua buah.
- (d) Nyalakan kompor yang telah diisi gas *gasoline butana* dan letakkan gelas beaker yang berisi MSMB dan akuades di atas kompor.
- (e) Homogenkan media dengan cara mengaduknya selama ± 30 menit sampai homogen dan mendidih dengan suhu $\pm 80^\circ C$
- (f) Matikan kompor dan pindahkan media MSMB pada labu erlenmeyer 500 mL.
- (g) Autoklap selama ± 20 menit pada suhu $121^\circ C$ dan tekanan 0.15 Mpa. Masukkan media pada kulkas laboratorium selama 1 hari. Media bisa digunakan setelah sekitar 4-5 hari setelah diinkubasi, hal ini dilakukan untuk melihat kesterilan media sebelum dilakukan penanaman dan simpan dalam inkubator steril pada *incubator shaker* pada 130 rpm suhu $37^\circ C$ selama 5 hari sebelum diinokulasikan mikroba (Hutagalung et al., 2019).

Proses pembuatan media MSMB dapat dilihat pada gambar 3.5 sebagai berikut.



(B)

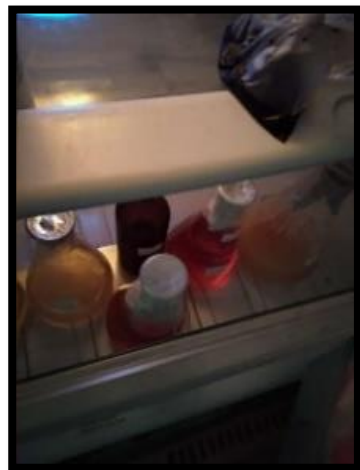
(A)



(C)



(E)



(G)



(D)



(F)



(H)



(I)



(J)

Gambar 3.5

(A) Pembuatan konsentrasi limbah batik 75%, (B) penimbangan bahan pembuatan media MSMB, (C) penuangan akuades pada gelas beaker, (D) mengaduk larutan media agar homogen, (E) penuangan MSMB pada labu erlenmeyer, (F) proses sterilisasi media, (G) penyimpanan media di kulkas, (H) memasukkan media MSMB pada *incubator shaker*, (I) mengatur rpm dan suhu penggojogan media, serta (J) penggojogan media MSMB selama 5 hari

Sumber: Dokumentasi Pribadi

d) Peremajaan Isolat Mikroba

Isolat murni bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* diperoleh dari laboratorium Universitas Jenderal Soedirman. Adapun tahap peremajaan isolat meliputi:

- (1) Preparasi media NA dengan cara mendinginkannya agar sesuai dengan suhu ruangan. Lalu media NA dipanaskan pada kompor dan dituangkan secara aseptik sebanyak 8 mL pada 6 cawan petri dan 4 tabung reaksi dengan. Menginokulasi isolat murni *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dari kultur koleksi ke media NA dan NA miring dengan cara menggoreskan satu ose dari kultur koleksi (stok *ampoule*) terhadap media NA dan NA miring dengan metode gores (*streak plate method*).
- (2) Inokulasi isolat murni dilakukan dengan cara jarum ose dipanaskan ujungnya pada api bunsen sampai berwarna kemerahan lalu diamkan sebentar. Ambil suspensi mikroba dari kultur stok *ampoule*, panaskan permukaan cawan petri

dan permukaan atas tabung reaksi media NA miring, lalu goreskan secara zigzag berulang kali. Lakukan inokulasi pada 4 media NA (2 isolat *Bacillus subtilis*, 2 isolat *Pseudomonas aeruginosa*) serta 4 NA miring (2 isolat *Bacillus subtilis* dan 2 isolat *Pseudomonas aeruginosa*).

- (3) Inokulasi konsorsium mikroba pada media NA dilakukan dengan cara menggoresnya secara zigzag pada dua sisi yang berbeda (bagian kiri isolat *Bacillus subtilis* dan bagian kanan *Pseudomonas aeruginosa*). Lakukan inokulasi pada 2 cawan petri media NA.
- (4) Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C yang diamati setiap 24 jam (Lukito et al., 2013; Ponraj *et al.*, 2011). Peremajaan kultur bakteri dilakukan selama 4 hari.



(D)

(E)

Gambar 3.6

(A) Pemanasan media NA, (B) Preparasi media NA pada labu ukur sebanyak 8 mL, (C) Pemanasan jarum ose pada api bunsen, (D) Inokulasi mikroba dengan metode gores (*streak plate method*) pada cawan petri, serta (E) menginkubasi inokulum pada inkubator statis suhu 37°C selama 4 x 24 jam

Sumber: Dokumentasi Pribadi

e) Adaptasi Isolat Murni dan Konsorsium Pada Limbah Cair Batik

Melakukan penyesuaian masing-masing isolat tunggal dan konsorsium mikroba terhadap limbah sebagai sumber nutrisi dan respon adaptasinya dilakukan melalui uji adaptasi dengan metode difusi cakram *Kirby-Baureur* pada media NA selama 3 hari yang diamati tiap 24 jam. Adapun tahapannya sebagai berikut:

- (1) Limbah batik yang telah dimasukkan ke dalam kulkas selama 3 hari dikeluarkan dan dinormalisasi agar suhunya sesuai dengan suhu ruangan. Lalu membuat limbah konsentrasi 75% dengan menambahkan 7,5 mL limbah dengan 2,5 mL akuades di gelas ukur 10 mL.
- (2) Aktivitas dekolorisasi dideteksi menggunakan uji difusi cakram metode *Kirby-Bauer*, yakni meneteskan limbah batik konsentrasi 75% pada *paper disc* lalu diletakkan pada media NA yang sudah diinokulasi mikroba selama 1 hari.
- (3) Lalu diinkubasi pada suhu 37°C statis selama 24 jam. Uji adaptasi teramati apabila tidak terdapat zona bening di sekitar *paper disc* lalu diukur zona hambatnya menggunakan jangka sorong selama 3 hari berturut-turut.
- (4) Selanjutnya pada hari ketiga pengamatan diameter zona hambat maka dilakukan inokulasi bakteri dari media NA terhadap media LB dengan cara digoreskan secara zigzag.
- (5) Menginkubasi media LB tersebut pada suhu 37°C statis yang diamati selama 1 x 24 jam. Peremajaan bakteri pada media LB dilakukan selama 3 hari.



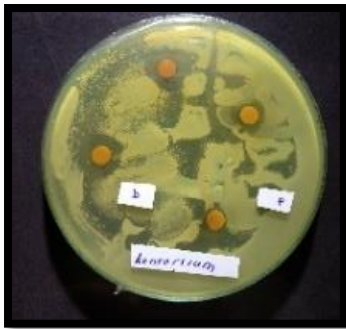
(A)



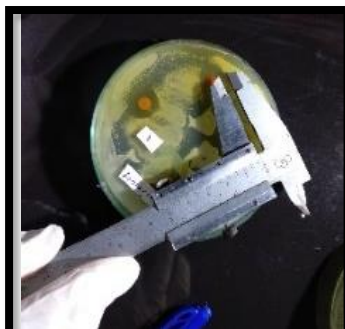
(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)

Gambar 3.7

(A) Pembuatan limbah batik konsentrasi 75%, (B) meneteskan limbah pada *paper disc*, (C) meletakkan *paper disc* pada media NA yang telah diinkubasi mikroba selama 1 hari, (D) pengamatan uji adaptasi pada inkubasi hari ketiga, (E) pengukuran diameter zona hambat, (F) inokulasi mikroba hasil uji adaptasi hari ketiga dari media NA terhadap LB, serta (G) inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

Sumber: Dokumentasi Pribadi

f) Perlakuan Terhadap Sampel Limbah

Tahap perlakuan terhadap sampel dimulai dari preparasi media MSMB (normalisasi dan menuangkan media pada botol kaca berukuran 100 mL sebanyak 52 mL), menginokulasi 0,52 mL isolat campuran (sama dengan 1% dari komposisi media) yang terdiri dari 0,26 mL tiap isolat murni yang akan dikonsorsiumkan dari media LB pada media MSMB menggunakan mikropipet, lalu diinkubasi menggunakan *thermoshaker incubator* secara gemetar selama 0, 1, 2, dan 3 hari pada suhu 37°C dan 130 rpm (Priyani *et al.*, 2018; Santhi & Sundari, 2015). Adapun tiap sampel yang diinokulasi mikroba memiliki 6 ulangan meliputi:

b. Perlakuan B₁

Media MSMB yang mengandung konsentrasi limbah batik 75% diinokulasikan 0,26 mL isolat murni *Bacillus subtilis* dan 0,26 mL isolat murni *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 1 hari

c. Perlakuan B₂

Media MSMB yang mengandung konsentrasi limbah 75% diinokulasikan 0,26 mL isolat murni *Bacillus subtilis* dan 0,26 mL isolat murni *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 2 hari

d. Perlakuan B₃

Media MSMB yang mengandung limbah cair konsentrasi 75% diinokulasikan 0,26 mL isolat murni *Bacillus subtilis* dan 0,26 mL isolat murni *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 3 hari

e. Perlakuan B₀

Media MSMB yang mengandung limbah cair konsentrasi 75% diinokulasikan 0,26 mL isolat murni *Bacillus subtilis* dan 0,26 mL isolat murni *Pseudomonas aeruginosa* yang diinkubasi selama 0 hari (kontrol). Adapun proses pemberian perlakuan terhadap 24 sampel dapat diamati pada gambar 3.8.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)



(H)



(I)

Gambar 3.8

(A) Menuangkan media MSMB sebanyak 52 mL pada botol kaca, (B) sampel yang mengandung media MSMB, (C) pipet volume yang diatur menjadi 260 μ m (26 mL) untuk inokulasi tiap isolat murni, (D) memasang tip pada mikropipet, (E) mengambil inokulum dari media LB, (F) menginokulasi mikroba dari media LB terhadap MSMB, (G) merekatkan *aluminium foil* pada botol kaca, (H) sampel dimasukkan pada *thermoshaker incubator*, (I) mengatur penggojogan sampel pada *thermoshaker incubator* selama 3 hari pada suhu 37 °C dan 130 rpm

Sumber: Dokumentasi Pribadi

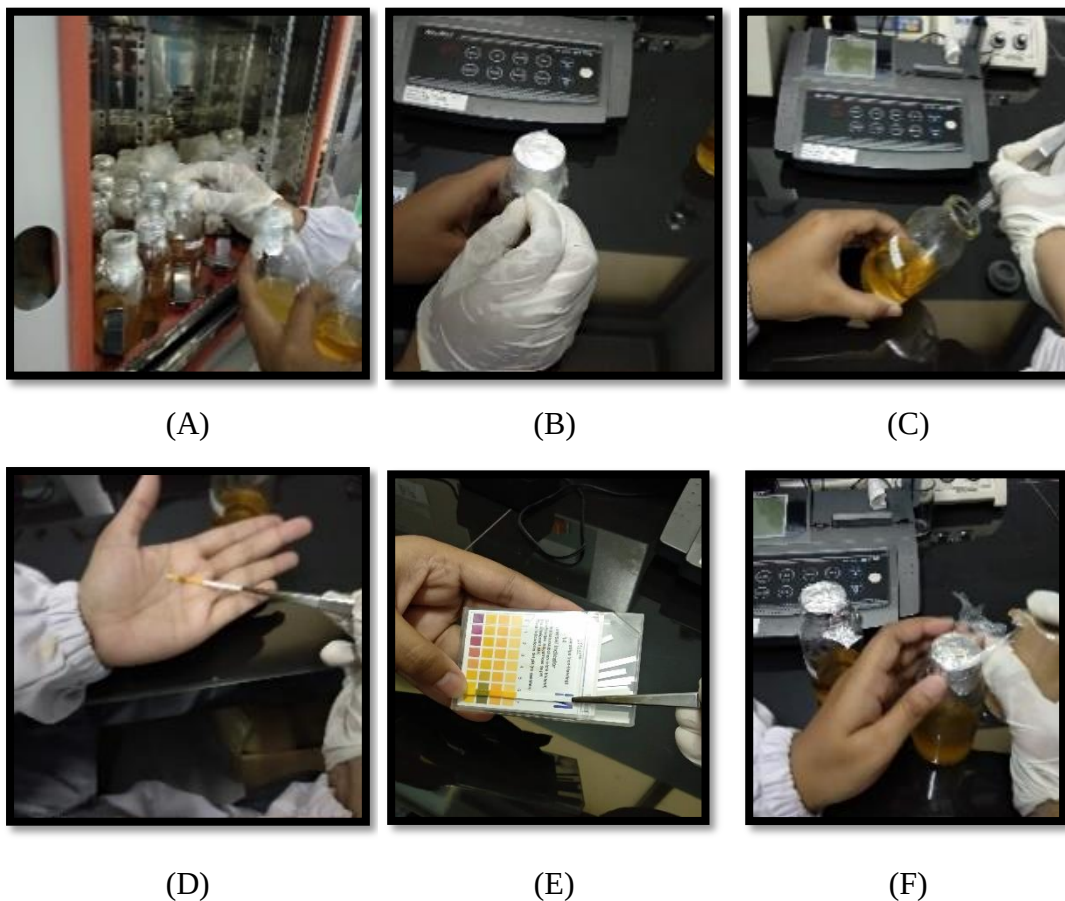
g) Pengukuran Parameter Limbah Cair Batik

Parameter fisikokimia yang diukur pada limbah cair batik adalah derajat keasaman (pH), efisiensi dekolorisasi limbah batik, serta kadar BOD (*Biological Oxygen Demand*).

(1) Pengukuran Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan mengukur 24 sampel penelitian dengan mencelupkan pH universal, dianginkan, dan dibandingkan warnanya dengan standar indikator pengukuran di *cover pack* pH universal. Hasil pengukuran pH

dihitung dengan anggapan bahwa apabila warna kertas mendekati 0,5 ke bawah maka dicatat 0,4 serta apabila mendekati 0,5 ke atas maka dicatat 0,6. Tahap pengukuran derajat keasaman dapat diamati pada gambar 3.9.



Gambar 3.9

(A) Mengeluarkan sampel yang telah diinkubasi, (B) membuka *plastic wrap* sampel, (C) mencelupkan kertas pH universal pada sampel, (D) menganginkan kertas pH universal, (E) membandingkan hasil pengukuran pada tabel indikator pH, serta (F) menutup rapat sampel dengan *plastic wrap*.

Sumber: Dokumentasi Pribadi

(2) Pengukuran Kadar BOD (*Biological Oxygen Demand*)

Metode pengukuran kadar BOD dilakukan dengan metode elektrokimia yang mengacu pada SNI 6989.72:2009 tentang Cara Uji Kebutuhan Oksigen Biokimia (*Biochemical Oxygen Demand* atau BOD) (Andika et al., 2020). Prinsip pengukuran BOD dilakukan dengan mengukur kandungan oksigen terlarut awal (DO_i) dari sampel setelah pengambilan contoh dan kandungan oksigen terlarut pada sampel yang telah diinkubasi selama 5 hari pada kondisi gelap dan suhu

tetap ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) yang disebut dengan DO_5 . Selisih DO_i dan DO_5 ($\text{DO}_i - \text{DO}_5$) merupakan nilai BOD yang dinyatakan dalam satuan miligram oksigen per liter (mg/L) (Agustira, Lubis, & Jamilah, 2013). Adapun tahap pengukuran kadar BOD meliputi:

1. Pembuatan larutan yang diperlukan dalam pengukuran kadar BOD yaitu :
 - a. Larutan Nutrisi : (1) Larutan Buffer Fosfat : Larutkan 21,25 gram Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), 0,85 gram amonium klorida (NH_4Cl) dalam 350 mL air bebas mineral, atur pH sampai 7,2 dengan penambahan larutan NaOH 30%, (2) NaOH 30% : timbang 30 gram NaOH lalu larutkan pada 100 mL akuades, (3) Larutan Magnesium Sulfat (MgSO_4): Larutkan 5,625 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan air bebas mineral/akuades kemudian encerkan hingga 250 mL, (4) Larutan Kalsium Klorida (CaCl_2): Larutkan 6,875 gram CaCl_2 dengan air bebas mineral/akuades kemudian encerkan hingga 250 mL, serta (5) Larutan Feri Klorida (FeCl_3): Larutkan 0,0625 gram $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan air bebas mineral/akuades kemudian encerkan hingga 250 mL
 - b. Larutan Air Pengencer : siapkan air bebas mineral yang jenuh oksigen minimal 7,5 mg/L dalam botol gelas kimia kemudian atur suhunya pada $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, lalu tambahkan 1 L air bebas mineral/aki dan masing-masing 1 mL larutan nutrisi ke dalam gelas kimia tersebut. Selanjutnya tambahkan 3 mL supernatan konsorsium bakteri atau mikroorganisme yang telah diinkubasi 3 hari secara penggojogan (larutan suspensi mikroba untuk sampel konsorsium dan tanpa konsorsium) ke dalam gelas kimia tersebut. Lalu diaduk sampai homogen. Dibuat jadi 2 larutan air pengencer yang satu ditambahkan suspensi konsorsium dan satunya suspensi limbah yang telah disentrifugasi).
 - c. Larutan Asam dan Basa : Larutan Basa asam sulfat (H_2SO_4) 1 N dan Larutan Asam (NaOH) 1 N
 - d. Larutan Kalium Iodida (KI) 10%: Larutkan 10 gram KI (Kalium Iodida) dengan air bebas mineral/akuades hingga 100 mL. Larutan yang terjadi dibuat 1 liter dengan menambahkan akuades. Konsentrasi larutan yang terjadi adalah 0,05 M (0,1 N).

- e. Larutan Indikator Amilum (Kanji): Tambahkan 2 gram kanji dan 0,2 gram asam salisilat ke dalam 100 mL akuades lalu aduk sambil dipanaskan hingga larut.
2. Aerasi sampel limbah yang diberi konsorsium pada media MSM cair yang telah diinkubasi selama 3 hari dan tanpa perlakuan (sampel utuh) pada suhu $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Sampel contoh uji (limbah cair batik konsentrasi 75%) dilakukan pengenceran serial dengan larutan air pengencer dengan faktor pengenceran 4 (volume contoh uji yang ditambahkan pada larutan sampel uji sebanyak 1 mL) dengan ketentuan sebagai berikut.

Tabel 3.4
Jumlah Contoh Uji Pengukuran Kadar BOD

Jenis Contoh Uji	Jumlah contoh uji (%)	Faktor pengenceran
Limbah industri yang sangat pekat	0,01 – 1,0	10000-100
Limbah yang diendapkan	1,0-5,0	100-20
<i>Effluent</i> dari proses biologi	5,0-25	20-4
Air sungai	25-100	1-4

Sumber: (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2017)

3. Pengukuran pH sampel, apabila tidak berada di kisaran 6,0-9,0 maka berikan penambahan H_2SO_4 atau NaOH
4. Selanjutnya pengukuran pengujian BOD dilakukan dengan beberapa cara yaitu:
 - a. Menyiapkan 8 botol winkler ukuran 500 mL yang mana mencantumkan label yang masing-masingnya 2 buah yaitu (A_1 , A_2 , B_1 , dan B_2)
 - b. Larutan sampel uji dan larutan air pengencer dimasukkan ke dalam masing-masing botol winkler ukuran 500 mL A_1 dan A_2 sampai meluap.
 - c. Pengocokan dilakukan beberapa kali menggunakan *vortex mixer*, kemudian akuades ditambahkan pada sekitar mulut botol winkler yang telah ditutup. Lalu bungkus secara hati-hati dengan kertas gelap.
 - d. Botol A_2 disimpan di bawah meja ruangan LAF (*Laminar Air Flow*) pada suhu $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari

- e. Botol A₁ ditambahkan 1 mL larutan MnSO₄, 1 mL larutan alkali iodida azida (larutan KI), 1 mL larutan H₂SO₄, serta 1-2 tetes indikator amilum. Lalu diukur menggunakan DO meter.
- f. Botol B₁ dan B₂ ditambahkan larutan air pengencer tanpa larutan sampel masing-masing 500 mL. Homogenkan dengan *vortex* selama 5 menit. Lalu botol B₁ dan B₂ dilakukan langkah yang sama mulai dari nomor 3 – 5.
- g. Pengerjaan botol A₂ (sampel dan konsorsium) dan B₂ (sampel dan konsorsium standar) yang telah disimpan pada inkubator 20°C ± 1°C selama 5 hari dilakukan langkah yang sama mulai dari poin e. Lalu diukur menggunakan DO meter.
- h. Penetapan blanko atau standar dilakukan dengan menggunakan larutan pengencer tanpa sampel uji. Hasil pengukuran yang diperoleh merupakan nilai oksigen terlarut 5 hari (B₂ sampel dan standar).

Perhitungan kadar BOD dengan rumus tertentu, yaitu :

$$\frac{(A_1 - A_2) - (B_1 - B_2)/V_b \times V_c}{P}$$

Keterangan :

A₁ = DO Sampel konsorsium hari ke-0 (mg/L)

A₂ = DO Sampel konsorsium hari ke-5 (mg/L)

B₁ = DO Blanko (sampel kontrol) hari ke-0 (mg/L)

B₂ = DO Blanko (sampel kontrol) hari ke-5 (mg/L)

V_b = Volume Suspensi Mikroba dalam Botol DO blanko (3 mL)

V_c = Volume Suspensi Mikroba dalam Botol Contoh Uji (3 mL)

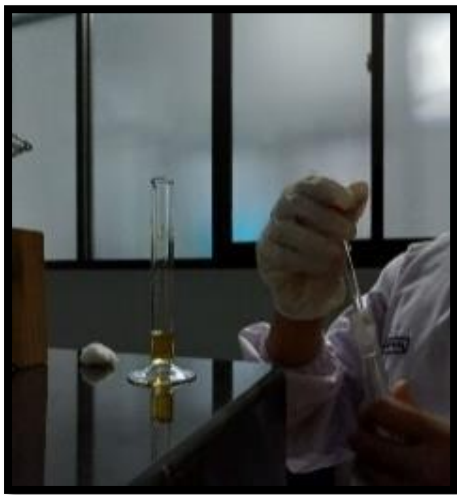
P = Perbandingan Volume Contoh Uji (V₁ = 1 mL) per volume total (V₂ = 500 mL)



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



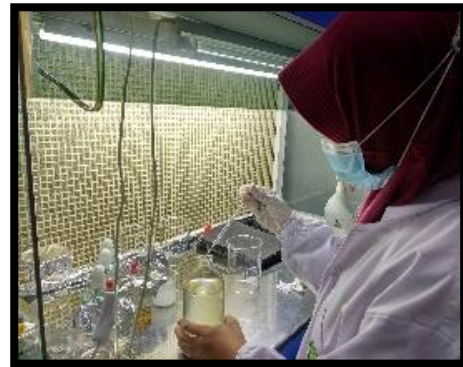
(G)



(H)



(I)



(J)



(K)



(L)

Gambar 3.10

(A) Preparasi larutan reagent (larutan nutrisi dan larutan pengencer), (B) Sentrifugasi sampel konsorsium mikroba agar diperoleh suspensi mikroba, (C) Pengenceran sampel faktor pengenceran 4 kali, (D) Pembuatan larutan pengencer yang ditambahkan suspensi konsorsium dan kontrol, (E) Penyimpanan sampel pengukuran kadar BOD sampel kontrol dan konsorsium selama 5 hari, (F)

Kalibrasi DO meter, (G) menambahkan sejumlah larutan lalu diukur menggunakan DO meter, (H) Pengukuran kadar DO_0 sampel kontrol dan konsorsium (A_1 dan B_1), (I) membuka plastik hitam pada sampel yang diukur kadar DO_5 , (J) menambahkan sejumlah larutan lalu diukur menggunakan DO meter, (K) menghomogenkan sampel dengan *vortex mixer*, (L) Pengukuran kadar DO menggunakan DO meter selama 3 kali

Sumber: Dokumentasi Pribadi

(3) Uji Efisiensi Dekolorisasi

Dekolorisasi limbah batik yang menggunakan pewarna reaktif diamati dengan mendeteksi adanya aktivitas dekolourisasi dengan uji difusi cakram pada media NA dan mengukur nilai absorbansi supernatan pada panjang gelombang 400-600 nm dari alat spektrofotometer yaitu *HACH DR 3900* setelah sampel diinkubasi selama 0,1,2, dan 3 hari. Metode pengujian warna yang digunakan mengacu pada SNI 6989.80:2011 tentang cara uji warna secara spektrofotometri. Adapun tahap pengukuran dekolourisasi sebagai berikut:

1. Seluruh sampel konsorsium pada botol kaca yang telah diinkubasi dan sampel tanpa inkubasi mikroba yang telah diinkubasi dipersiapkan untuk diantarkan ke lokasi pengukuran sampel di UPTD Laboratorium Dinas Lingkungan Hidup Soreang Kabupaten Bandung.
2. Setelah sampai di lokasi pengukuran, sampel dipersiapkan untuk disentrifugasi menggunakan alat *centrifuge*. Proses sentrifugasi dilakukan dengan cara memasukkan sampel pada alat *centrifuge* lalu memutar *rotor speed* ke angka 4 (4000 rpm) dan *timer min.* 20 menit (Ning et al., 2018; Ponraj et al., 2011).
3. Membuat larutan reagen (akuades) dan larutan kerja berupa unit ptCo. Dikarenakan karakter fisik sampel sangat pekat, maka dilakukan pengenceran bertingkat dengan faktor pengenceran 10 kali (10^{-10}) menggunakan akuades.
4. Kemudian ambil 1 mL dari sampel tersebut berupa supernatan yang akan diperiksa absorbansinya pada panjang gelombang antara 320-1100 nm yang tampil pada alat spektrofotometer berupa *HACH model DR 3900* (Bayoumi et al., 2014; Karim et al., 2018).
5. Dekolorisasi pewarna reaktif diamati nilai absorbansi supernatan pada panjang gelombang 455 nm (puncak absorbansi pada panjang gelombang

yang optimal) (Santhi & Sundari, 2015). Pengukuran efektivitas dekolorisasi dilakukan melalui pemerolehan absorbansi yang dimasukkan ke dalam rumus penghitungan sebagai berikut:

$$\text{Efisiensi dekolorisasi (\% dekolorisasi)} = (A_i - A_t) / A_i \times 100$$

Nilai A_i adalah absorbansi awal sampel (limbah pada media MSMB yang telah diinkubasi selama 0, 1, 2, dan 3 hari) dan A_t adalah absorbansi akhir sampel yang telah diberikan perlakuan (Joshi et al., 2015; Kulandaivel et al., 2014). Proses pengukuran absorbansi sampel dapat diamati pada gambar 3.11 sebagai berikut.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

Gambar 3.11

(A) Sampel dikeluarkan dari alat *thermoshaker incubator*, (B) preparasi sampel yang diantarkan ke lokasi pengukuran, (C) sentrifugasi sampel, (D) persiapan larutan kerja berupa unit ptCo, (E) pengenceran serial dengan faktor pengenceran 10 kali, (F) pengukuran absorbansi menggunakan alat spektrofotometer *HACH DR 3900*

Sumber: Dokumentasi Pribadi

Adapun tahap alur penelitian secara keseluruhan dapat diamati pada gambar 3.12 sebagai berikut.

**Gambar 3.12**

Skema Alur Penelitian

Sumber: Data Pribadi

1.5.3. Tahap Pengolahan Data

- a) Data yang diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi zat warna limbah yang disertai parameter pendukung seperti pH pada 24 sampel dan kadar BOD pada sampel kontrol dan konsorsium lalu dimasukkan pada instrumen penelitian observasi uji laboratorium menggunakan *mechanical devices* yang selanjutnya dilakukan analisis dekriptif dan analisis statistik inferensial dengan memanfaatkan *software* SPSS melalui analisis varians satu jalur (*one way ANAVA*).
- b) Menyusun data hasil penelitian untuk penyelesaian skripsi.

1.6. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi uji laboratorium dan observasi menggunakan alat *mechanical devices* berupa DO meter. Peneliti memperoleh data kuantitatif dari hasil observasi uji laboratorium berupa indikator, kadar atau persentase, keterangan, dan observasi yang disajikan dalam instrumen penelitian memerhatikan daftar nama subjek dan faktor yang diselidiki serta pencatatan kondisi peningkatan menurut kebutuhannya mulai dari tahap peremajaan isolat, uji aktivitas dekolorisasi, pengembangan konsorsium sampai mengujinya langsung pada sampel limbah batik yang memerhatikan persentase efisiensi dekolorisasi pada limbah dengan parameter pendukung berupa pH dan kadar BOD. Pengamatan dekolorisasi dan parameter pendukung berupa pH tersebut dilakukan setelah sampel diinkubasi selama 0, 1, 2, dan 3 hari. Hal ini berdasarkan beberapa penelitian menunjukkan bahwa efisiensi dekolorisasi pewarna sintetik pada limbah cair tekstil dan batik cukup tinggi pada pengamatan waktu inkubasi selama hari ke-1 sampai ke-3 (Agil & Sutariningsih, 2016; R. S. Dewi, Mumpuni, & Tsabitah, 2020; Garg *et al.*, 2020; Junior, Cavalcanti, & Alves, 2015; Mahmood *et al.*, 2015; Tripathi & Srivastava, 2011; Wang *et al.*, 2013). Sedangkan untuk pengukuran kadar BOD dilakukan pada dua sampel (kontrol dan penambahan konsorsium *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*) selama 5 hari (Andika *et al.*, 2020).

1.7. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian merupakan alat bantu yang digunakan peneliti untuk mengumpulkan, mengolah, dan menyajikan data agar sistematis dan mudah diperolehnya (Sugiyono, 2013). Adapun instrumen penelitian yang digunakan oleh peneliti sebagai berikut.

Tabel 3.5
Instrumen Observasi Pengukuran Absorbansi Limbah Cair Batik

Perlakuan	Jumlah Ulangan					
	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1 hari (B ₁)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2 hari (B ₂)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3 hari (B ₃)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 0 hari/Kontrol (B ₀)						

Sumber: Data Pribadi

Tabel 3.6
Instrumen Observasi Pengukuran Efisiensi Dekolorisasi (Persentase) Limbah Cair Batik

Perlakuan	Jumlah Ulangan					
	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 1 hari (B ₁)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 2 hari (B ₁)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 3 hari (B ₁)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 0 hari/Kontrol (B ₀)						

Sumber : Data Pribadi

Tabel 3.7

Instrumen Observasi Pengukuran Adaptasi Mikroba Difusi Cakram *Kirby-Bauer* (mm) Limbah Cair Batik

Perlakuan	Hari Ke-		
	1	2	3
Isolat <i>Bacillus subtilis</i> (B ₁)			
Isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B ₂)			
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B ₃)			

Sumber: Data Pribadi

Tabel 3.8

Instrumen Observasi Pengukuran Kadar BOD₅ (mg/L) Limbah Cair Batik

No.	Jenis Sampel	Volume Contoh Uji (mL)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	Kadar BOD ₅ (mg/L)	Rata-rata (mg/L)
1.	Kontrol							
2.	Konsorsium							

Sumber: Data Pribadi

Tabel 3.9

Instrumen Observasi Pengukuran Derajat Keasaman (pH) Limbah Cair Batik

Perlakuan	Jumlah Ulangan					
	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 1 hari (B ₁)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 2 hari (B ₂)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 3 hari (B ₃)						
Konsorsium <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inkubasi 0 hari/Kontrol (B ₀)						

Sumber: Data Pribadi

1.8. Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berasal dari instrumen tes observasi uji laboratorium yang dirancang sendiri. Data yang terkumpul dalam penelitian ini akan dilakukan analisis data dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1.8.1. Uji Normalitas

Data yang diperoleh merupakan data primer dan berskala rasio berupa hasil pengukuran efisiensi dekolorisasi melalui penggunaan konsorsium *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada 24 uji sampel limbah cair batik. Guna mengetahui data yang diperoleh berasal dari populasi yang berdistribusi normal atau tidak, maka dilakukan uji normalitas. Data primer tersebut dilakukan uji normalitas dengan uji *Kolmogorov-smirnov* melalui penggunaan *software SPSS (Statistical Product and Service Solution)* versi 25. Jika kelompok data telah diambil dari populasi yang berdistribusi normal, maka analisis dilanjutkan dengan uji homogenitas.

1.8.2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas varians yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah uji *Levene (Levene test)* melalui penggunaan *software SPSS* versi 25. Adapun alasan digunakannya uji *Levene* adalah mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan (Nuryadi et al., 2017). Apabila data varians bersifat homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik yaitu analisis varians satu jalur (*one way ANOVA*). Serta apabila data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji non-parametrik yaitu uji analisis ragam peringkat satu arah *Kruskal-Wallis*.

1.8.3. Uji Hipotesis

Pada penelitian ini, uji hipotesis menggunakan analisis varians satu jalur (*ANOVA one way*) melalui *software SPSS* versi 25. Alasan penggunaannya adalah untuk menguji hipotesis komparatif rata-rata 24 uji sampel, dengan variabel bebas yang diperhatikan hanya satu, yaitu efisiensi dekolorisasi konsorsium mikroorganisme. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian *post hoc test* (uji *t-post hoc*) digunakan untuk melihat ada tidaknya perbedaan rata-rata secara lebih detail. Uji *t-post hoc* adalah uji *Tukey* atau *HSD (High Significantly Difference)* yang

dikenal uji nyata beda jujur (uji BNJ) (Hernawan, 2020). Alasan penggunaannya adalah untuk membandingkan seluruh pasangan rata-rata perlakuan dan mengetahui variabel manakah yang memiliki perbedaan signifikan. Hal ini sesuai dengan maksud penelitian yang dilakukan oleh peneliti karena mengkaji tentang perbandingan efisiensi dekolorisasi pewarna sintetik limbah cair batik yang dilihat dari nilai rata-rata kelompok sampel limbah berdasarkan variasi waktu inkubasi.

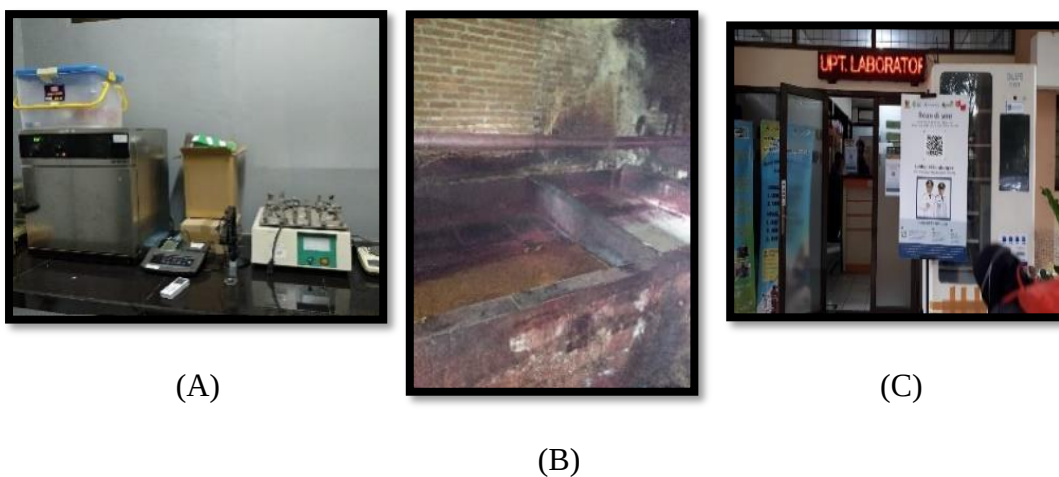
1.9. Waktu dan Tempat Penelitian

1.9.1. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Mei 2022. Jadwal Penelitian dilampirkan dalam tabel 3.10.

1.9.2. Tempat Penelitian

Lokasi penelitian akan dilakukan di beberapa tempat sebagai berikut:



Gambar 3.13

Lokasi Penelitian : (A) Laboratorium Mikrobiologi Pendidikan Biologi Universitas Siliwangi, (B) Kolam pewarnaan UMKM batik Sukapura Cigeureung, dan (C) Laboratorium UPTD Dinas Lingkungan Hidup Kabupaten Bandung
Sumber: Dokumentasi Pribadi

- 1) Laboratorium Botani dan Mikrobiologi, Jurusan Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Siliwangi, sebagai tempat pengembangan konsorsium mikroorganisme dan pemeriksaan kadar pH dan BOD sampel limbah batik.
- 2) Kawasan Sentra Batik Kota Tasikmalaya, tempat pengambilan sampel diambil dari 1 titik lokasi yang berada kampung Cigeureung (Industri Batik Sukapura) yang memiliki tempat *outlet* dan pembuatan yang sama.

- 3) Laboratorium UPTD Dinas Lingkungan Hidup Soreang, Kabupaten Bandung, sebagai tempat penelitian sampel untuk mengukur absorbansi dalam uji efisiensi dekolorisasi pada sampel dengan metode spektrofotometri alat *HACH DR 3900*.

Tabel 3.10
Jadwal Kegiatan Penelitian

[illegible]

[illegible]

Sumber: Data Pribadi