

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengelolaan Limbah Agroindustri Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Februari sampai dengan Juli 2015.

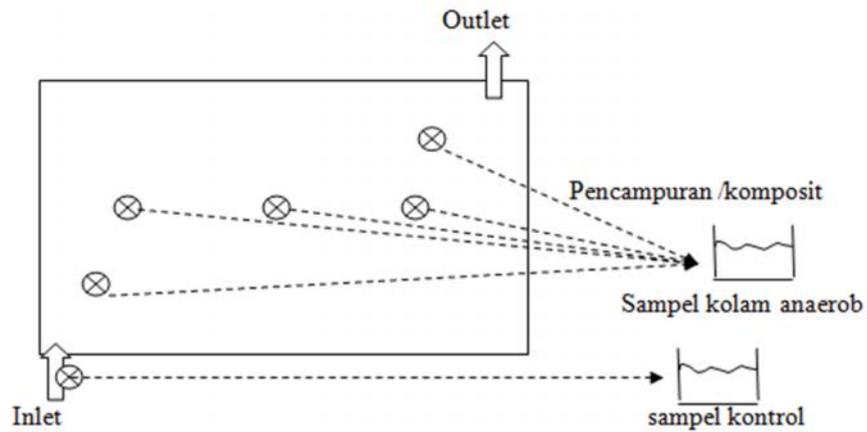
3.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan terdiri dari *High Performance Liquid Chromatograph* (HPLC) dengan kolom ODS (Zorbax-ODS, 4.6 (I.D.) x 250 mm, Simadzu-Dipont) dan multichannel UV detektor (*photodiode array* detektor, model: SPD-M10A, Shimadzu), komputer, sentrifuge, gelas syringe, selang silicone, kuvet, tabung sampel, erlenmeyer, pipet volumetrik, bulb pipet, rak tabung reaksi dan alat penunjang lainnya.

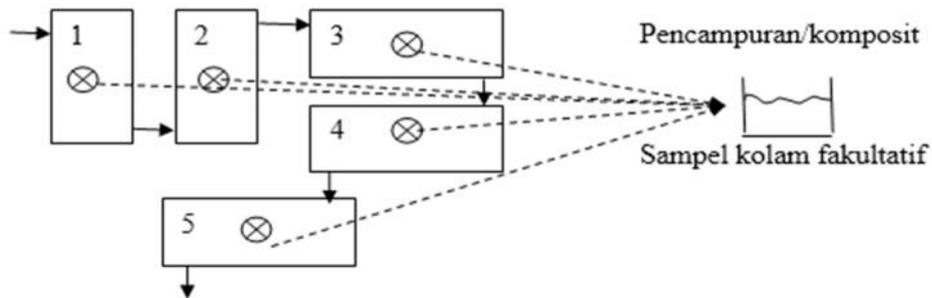
Bahan-bahan yang digunakan adalah air limbah industri gula di PT Gunung Madu Plantation, kultur campuran dengan merek dagang AGB dan SGB, metanol, diisopropyl eter, aquades, heksan, dietil eter, klorofom, dan aseton.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode sampling yang dilakukan dengan 5 titik pengambilan sampel (SNI 6989.59, 2008). Penelitian ini terdiri dari 2 bagian pengambilan sampel. Pertama, pengambilan sampel dilakukan pada tangki pembiakan *Activated Growth Bacteria* (AGB) dan *Super Growth Bacteria* (SGB) sehingga didapatkan 2 sampel. Pada bagian kedua, pengambilan sampel dilakukan sebanyak 5 titik pada kolam anaerob dan 5 titik pada kolam fakultatif. Kelima titik sampel kemudian dilakukan pencampuran atau komposting sehingga didapatkan 2 sampel masing-masing yaitu 1 sampel dari kolam anaerob dan 1 sampel dari kolam fakultatif. Setiap pengambilan sampel diulang sebanyak tiga kali sehingga menghasilkan $4 \times 3 = 12$ satuan percobaan. Pengambilan sampel juga dilakukan pada inlet sebagai sampel kontrol dalam hal ini sampel inlet merupakan sampel air limbah yang belum dilakukan penambahan bakteri. Sampel dianalisis perubahan struktur komunitas mikroorganisme dengan metode quinon. Hasil evaluasi struktur komunitas mikroba dari kedua kultur campuran AGB dan SGB digunakan untuk membandingkan hasil evaluasi struktur komunitas pada masing-masing kolam anaerob yang telah ditambahkan AGB dan kolam fakultatif yang telah ditambahkan SGB. Hasil pengamatan deskripsi disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.



(a)



(b)

Keterangan : 1 : kolam fakultatif 1 4 : kolam fakultatif 4
 2 : kolam fakultatif 2 5 : kolam fakultatif 5
 3 : kolam fakultatif 3

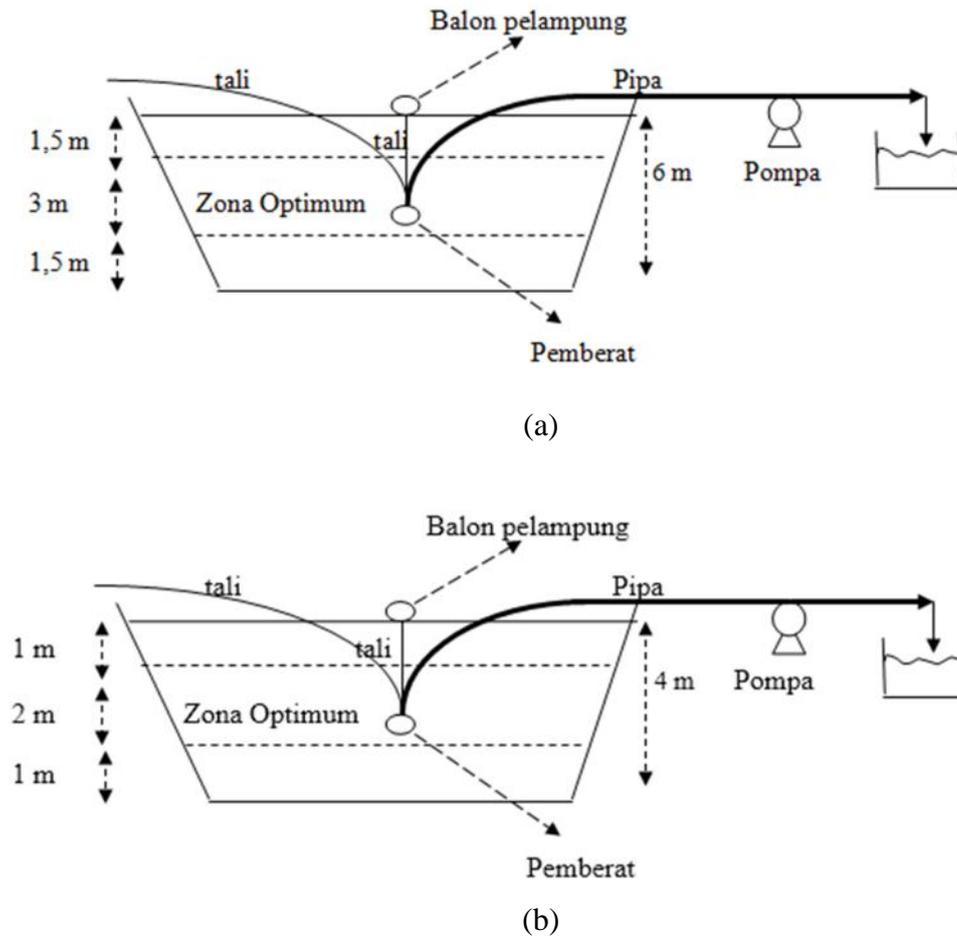
Gambar 4. Titik pengambilan sampel; (a) kolam anaerob, (b) kolam fakultatif

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

Penelitian awal dengan pengambilan sampel yang berasal dari biakan bakteri AGB (*Activated Growth Bacteria*) dan SGB (*Super Growth Bacteria*) pada tangki pembiakan. Pengambilan sampel pada tahap kedua berasal dari air limbah pada masing-masing kolam anaerob yang telah ditambahkan AGB (*Activated Growth*

Bacteria) dan kolam fakultatif yang telah ditambahkan SGB (Super Growth Bacteria). Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan pipa vakum sepanjang 6 m sebanyak 5 liter. Sebelum dilakukan analisis quinon, sampel yang telah diperoleh segera didinginkan dengan es dan disimpan pada suhu -20°C (Hasanudin, 2005).



Gambar 5. Teknik pengambilan sampel (a) Penampang melintang kolam anaerob (b) Penampang melintang kolam fakultatif

3.4.2 Ekstraksi Quinon

3.4.2.1 Ekstraksi Menggunakan Klorofom dan Metanol

Quinon diekstrak dari sel mikroba dalam sampel dengan campuran pelarut organik berupa campuran kloroform:metanol (2:1, v/v). Sampel air limbah sebanyak 1000 ml difiltrasi menggunakan vakum filter dan kertas filter. Tujuan dilakukan filtrasi adalah untuk mengambil padatan pada air limbah yang kemudian akan diekstrak quinonnya. Residu yang dihasilkan pada proses ini ditempatkan dalam erlenmeyer bersama kertas saring. Sampel dalam erlenmeyer kemudian diekstrak dengan campuran kloroform:metanol yaitu 2:1 dan dilakukan pengocokkan dengan *shaker* selama 30 menit. Setelah dilakukan pengocokkan, sampel difiltrasi dan hasil filtrat di tempatkan pada labu terong (*eggplant flask*). Pemurnian pada tahap ini dilakukan sebanyak 3 kali. Sampel labu terong kemudian dievaporasi untuk didapatkan residu nya. Proses evaporasi menggunakan *rotary vacum evaporator* dengan suhu pemanas nya 35°C dan suhu kondensasi nya sekitar $9-10^{\circ}\text{C}$

3.4.2.2 Pemurnian Quinon dengan Heksan

Ekstrak quinon kasar dalam labu terong (*eggplant flask*) yang telah diperoleh di atas diekstraksi kembali dengan air dan heksan untuk menghilangkan ketidakmurnian. Larutan heksan yang digunakan sebanyak 20 ml. Residu yang telah diekstrak dengan heksan ditempatkan pada tabung sentrifus 50 ml dan ditambahkan 10 ml air ke dalam tabung. Ekstraksi dilakukan 3 kali dan kemudian dilakukan pengocokkan 5 menit (Hu *et al.*, 1999). Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm, hasil proses sentrifugasi didapatkan 2 lapisan, lapisan bawah merupakan air dan lapisan atas yaitu larutan heksan bersama ekstrak quinone

kasar. Pada bagian atas diambil menggunakan pipet tetes dan ditempatkan pada labu terong. Kemudian ekstrak quinon kasar dievaporasi menggunakan *rotary vakum evaporator* (suhu $<40^{\circ}\text{C}$) dengan tekanan vakum (Hiraishi 1999; Hu *et al.*, 1999).

3.4.2.3 Pemurnian dan Pemisahan Quinon

Quinon hasil dari ekstraksi pada tahap diatas dilakukan pemurnian dan pemisahan berdasarkan perbedaan polaritas. Kolom yang digunakan yaitu Sep-Pak, dengan diameter dalam 10 mm, panjang 20 mm, dan 600 mg silika gel.. Lima ml heksan dilewatkan pada *cartridge* Sep-Pak, dan kemudian ekstrak heksan quinon dibiarkan pada *cartridge* pada kecepatan aliran tetap. Menaquinon dan ubiquinon dipisahkan dengan dietil eter dalam larutan heksan dengan konsentrasi 2% dan 10% dietil eter. Kemudian pemisahan menaquinon dan ubiquinon dari Sep-Pak dievaporasi dan kemudian residu evaporasi dilarutkan kembali dalam aseton untuk analisis kuantitatif selanjutnya (Hu *et al.*, 1999).

3.4.2.4 Penentuan Spesies dan Konsentrasi Quinon

Tipe dan konsentrasi quinone ditentukan dengan *High Performance Liquid Chromatograph* (HPLC) yang dilengkapi dengan kolom ODS (Zorbax-ODS. 4.6 (I.D) x 250 mm, Shimadzu-Dupont) dan multi-channel detektor UV (detektor *array photodiode*, model: SPD-M10A, Shimadzu). Campuran metanol dan diisopropyl eter (9:2, v/v) digunakan untuk fase gerak pada laju alir 1,0 ml/min. Temperatur pada kolom oven sebesar 35°C . Spesies quinone diidentifikasi berdasarkan lama waktu (*retention time*) pada kolom HPLC dengan standard quinon dan identifikasi quinon spesies dengan rekaman penyerapan spektrum

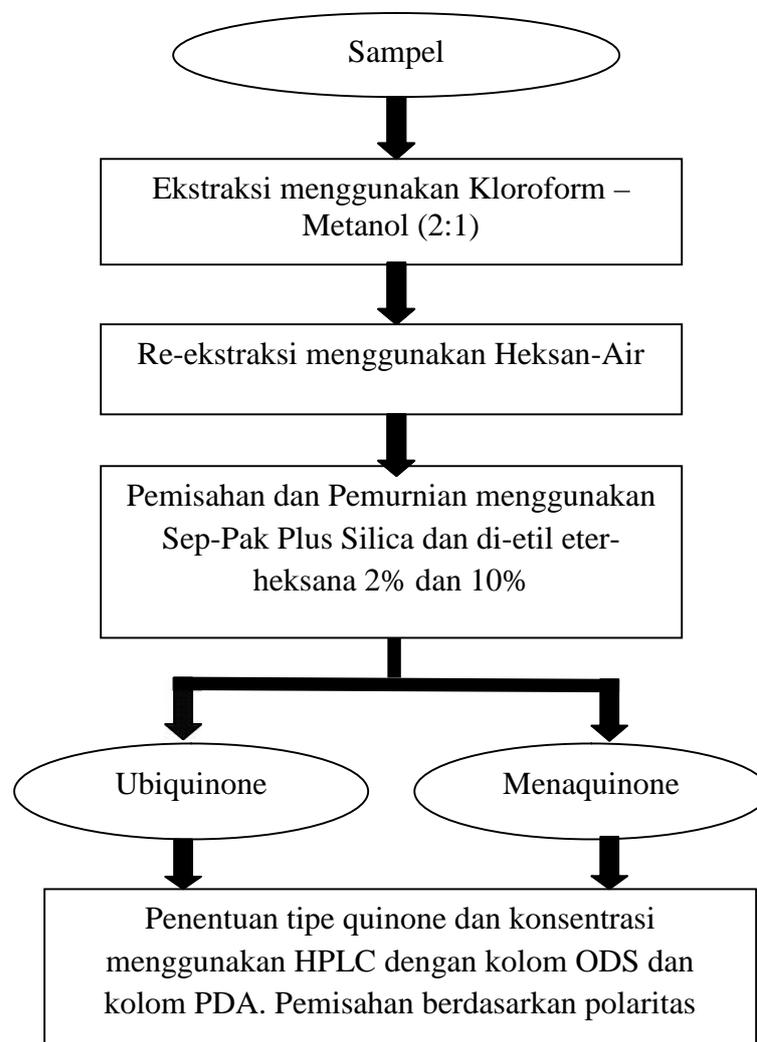
(*Absorption spectra*) yaitu UV spektrum pada masing-masing peak di dalam multi-channel detektor UV. Tipe quinon diidentifikasi dengan berdasarkan hubungan linear antara logaritmik *retention time* dari quinon dan jumlah unit isopren (ENIU). Kuantitatif standar untuk ubiquinon dan menaquinon menggunakan ubiquinon 10 unit isopren dan vitamin K1. ENIU dapat diperkirakan dengan persamaan berikut :

$$\text{ENIU}_k = a + b \log (\text{ET}_k/\text{ET}_{\text{std}}) + c [\log(\text{ET}_k/\text{ET}_{\text{std}})]^2 \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

ET_k : elution time spesies quinon k
 ET_{std} : elution time standar quinon
 a, b, dan c : data diperoleh dari sistem HPLC

Jumlah quinon dikalkulasikan dari area *peak* berdasarkan koefisien penyerapan mol (ubiquinon: 14,4 mM⁻¹cm⁻¹, menaquinon: 17,4 mM⁻¹cm⁻¹, dan plastoquinon: 15,3 mM⁻¹cm⁻¹). Fraksi quinon dikalkulasikan sebagai rasio komposisi quinon pada spesies k untuk total komposisi quinon. Singkatan tipe quinon yaitu ubiquinon: UQ, menaquinon: MK, Plastoquinon: PQ, vitamin K1: VK1. Tata nama dari quinon bakteri berdasarkan singkatan tipe quinon diikuti garis dan jumlah unit isopren pada sisi cabangnya. Sebagai contoh, UQ-10 yang diartikan ubiquinon dengan 10 unit isopren pada sisi cabangnya, dan MK-9(H₂) diartikan menaquinon dengan 9 unit isopren pada sisi cabangnya, dan salah satu ikatan rangkapnya yaitu dua atom hidrogen (Hu *et al.*, 2001).



Gambar 6. Diagram alir analisis quinone (Hasanudin, 2005 ; Hiraishi, 1999)

3.5 Pengamatan

3.5.1 *Quinone profile*

Pengamatan *quinone profile* dilakukan untuk mengetahui adanya mikroba dominan yang terkandung dalam air limbah industri gula. Pengamatan dilakukan terhadap nilai rasio ubiquinone dan menaquinone (UQ/MK) dan perubahan

struktur komunitas mikroba pada air limbah industri gula. Untuk mengevaluasi perubahan struktur komunitas mikroba pada sampel air limbah kolam anaerob, kolam fakultatif, dan biakan AGB (*Activated Growth Bacteria*) dan SGB (*Super Growth Bacteria*) yang dapat mengindikasikan profil quinon yaitu dengan menghitung *diversity* (DQ), *bioenergetic divergence* (BDq), dan *index dissimilarity* (D). Nilai DQ, BDq, dan D dihitung melalui persamaan sebagai berikut:

$$DQ = \left(\sum_{k=1}^n (\sqrt{f_k}) \right)^2 \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$BD_q = (\sqrt{UQ} + \sqrt{MK} + \sqrt{PQ + VK1})^2 \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$D(i, j) = 1/2 \sum_{k=1}^n |f_{ki} - f_{kj}| \quad \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan :

f_k : fraksi mol spesies quinon k

n : jumlah quinon spesies dengan mol fraksi 0,001

f_{ki} dan f_{kj} : fraksi mol spesies quinon k untuk sampel i dan j

(Sumber : Hasanudin, 2005; Hiraishi, 1999)