**BAB III**

**METODOLOGI PENELITIAN**

**3.1 Tahapan Penelitian**

Penelitian yang dilakukan dalam tugas akhir ini adalah penelitian dalam skala laboratorium. Dalam pelaksanaan penelitian studi penyisihan zat warna *Colour Index Reactive Blue 5* (CIRB5) pada suhu 40oC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 hasil isolasi dari tanah perkebunan coklat di Provinsi Riau ini dilakukan dalam beberapa tahap. Adapun tahapan penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.1** berikut ini :

Mulai

Penyiapan alat, bahan dan mikroorganisme

Penyiapan substrat pertumbuhan (PDA dan PDC)

**PERSIAPAN PENELITIAN**

* Pembuatan Larutan Stock Zat Warna CIRB5 Konsentrasi 1000 mg/L dengan Aquadest
* Pembuatan Larutan Stock Zat Warna CIRB5 Konsentrasi 1000 mg/L dengan PDC
* Pembuatan Larutan Stock Cr6+ Konsentrasi 1000 mg/L
* Aklimatisasi jamur dengan konsentrasi zat warna 10 sampai 100 mg/L
* Membuat kurva kalibrasi zat warna CIRB5

**PENELITIAN PENDAHULUAN**

* Penentuan pH optimum (3, 4 dan 5) untuk penyisihan zat warna CIRB5 oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada berbagai variasi konsentrasi zat warna (yaitu 60, 80 dan 100 mg/L) pada suhu kamar/ruang (ambien)

## PENELITIAN UTAMA

* Mengamati pengaruh umur jamur muda (fase logaritmik) *Trichoderma asperellum* TNC52 terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan
* Mengamati pengaruh umur jamur tua (fase stationer) *Trichoderma asperellum* TNC52 terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan
* Mengamati pengaruh lingkungan (asin)/kehadiran 1% NaCl terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan
* Mengamati pengaruh 5 mg/L logam berat Cr6+ terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan
* Pemeriksaan sampel penelitian menggunakan alat *UV-Vis Spektrofotometer* Mini 1240 SHIMADZU

Variasi yang dilakukan :

* Konsentrasi warna CIRB5 (60, 80 dan 100 mg/L)

Parameter yang dianalisa :

* Konsentrasi warna CIRB5 (mg/L)
* VSS (mg/L)
* Persen penyisihan warna (%)
* Laju penyisihan

Analisa dan interpretasi parameter/data untuk masing-masing percobaan

Penarikan kesimpulan

Penulisan Laporan

**Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian**

**3.2 Penyiapan Alat, Bahan dan Mikroorganisme**

**3.2.1 Alat yang Digunakan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. *Jarum Ose* yaitu alat untuk mengambil biakan jamur pada media cair untuk dipindahkan pada media agar miring.
2. *Mikroskop* **XS-201** yaitu alat untuk melihat dan mengamati jenis jamur yang telah tumbuh dan mengidentifikasi bila terjadi kontaminasi.
3. Kaca Preparat (*Preparat Glass*) yaitu alat untuk menyimpan biakan jamur yang akan dilihat dan diamati dengan menggunakan *mikroskop*.
4. *Inkubator*  **WTB BINDER** yaitu alat untuk menginkubasi jamur.
5. *Pembakar Bunsen* yaitu alat untuk memanaskan (mensterilkan) *jarum Ose* sebelum mengambil biakan jamur.
6. *Labu Erlenmeyer 250 mL* **BORO 3.3** yaitu untuk tempat jamur melakukan aklimatisasi, penelitian pendahuluan dan juga penelitian utama yang berlangsung secara batch.
7. *Autoclave* yaitu alat untuk mensterilisasi media menggunakan uap bersuhu dan bertekanan tinggi (121oC, 15 lbs) selama kurang lebih 15 menit.
8. *Shaker* **KOTTERMANN 4020** dan **TS-2000A VDRL SHAKER** yaitu alat yang digunakan agar media dan jamur yang ada dalam *labu Erlenmeyer* tercampur dengan baik.
9. *Waterbath Shaker* yaitu alat yang digunakan agar media dan jamur yang ada dalam *labu Erlenmeyer* tercampur dengan baik dengan pengaturan suhu yang disesuaikan dengan penelitian yang dilakukan.
10. *Spektrofotometer* **MERCK SQ 118** yaitu alat untuk mengukur transmitan atau absorban dari sampel yang sedang diteliti dengan panjang gelombang tertentu (panjang gelombang yang digunakan disesuaikan dengan sampel yang diukur dan output yang dihasilkan berupa nilai absorban dari sampel).
11. *Oven 105oC* **INTERNATIONAL** yaitu alat untuk memanaskan sampel sehingga dapat digunakan untuk pengukuran TSSdan *Oven 600oC* **NEY M-525 SERIES II** yaitu alat untuk memanaskan sampel sehingga dapat digunakan untuk pengukuran FSS.
12. *Timbangan analitis* **DENVER INSTRUMENT COMPANY A-250** yaitu alat untuk menimbang zat-zat yang diperlukan dalam pembuatan pereaksi dan menimbang berat kentang yang akan digunakan dalam penelitian ini.
13. *Sentrifuge* **SHANGHAI SURGICAL INSTRUMENT FACTORY** yaitu alat untuk memisahkan antara cairan dengan padatan biomassa jamur.
14. *pH meter*  **EUTECH Instruments Eco Scan** yaitu alat untuk mengukur pH.
15. *Termometer* yaitu alat yang digunakan untuk mengukur temperatur.
16. *Labu Ukur 1000 mL* **PYREX** yaitu alat yang digunakan untuk membuat larutan atau limbah buatan (artifisial).
17. *Kertas Timbang* yaitu untuk tempat menimbang bahan kimia (*Dextrose*) dan zat warna CIRB5.
18. *Kuvet 10 mL* **MILTON COMPANY** yaitu alat untuk pemeriksaan konsentrasi warna dengan alat *Spektrofotometer*.
19. *Cawan Krus 15 mL* yaitu wadah untuk mengeringkan padatan pada *oven* 105oC dan 600oC.
20. *Desikator* yaitu tempat yang digunakanuntuk menyimpan *cawan krus* setelah pengeringan padatan agar suhu dan kelembabannya stabil.
21. *Kompor Listrik* **MASPION** yaitu alat yang digunakan untuk memasak kentang untuk pembuatan media.
22. *UV-Vis Spektrofotometer* Mini 1240 **SHIMADZU**yaitu alat untuk mengukur transmitan atau absorban dari sampel yang sedang diteliti sesuai dengan panjang gelombang yang terukur (output yang diperoleh berupa grafik serta nilai absorban terhadap panjang gelombang). Dengan diperolehnya spektrum absorbansi molekul kimia dari sampel yang diteliti maka dapat ketahui bila diberi perlakuan tertentu apakah terjadi transformasi pada struktur molekul senyawa kimia.

Peralatan-peralatan lain yang mendukung penelitian ini adalah sebagai berikut :

* + Botol Aquadest
  + Gelas Kimia 100, 200 dan 1000 mL
  + Gelas Ukur 100 mL
  + Labu Ukur 100 mL
  + Tabung Reaksi
  + Filler
  + Pipet Tetes
  + Spatula
  + Tang Krus

**3.2.2 Bahan yang Digunakan**

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

* Kentang yaitu bahan yang digunakan dalam pembuatan media baik itu media cair maupun media padat (agar).
* Zat warna CIRB5 yaitu zat warna tekstil yang digunakan dalam penelitian.
* Dextrose yaitu sumber glukosa yang ditambahkan ke dalam media.
* BactoTM Agar yaitu bahan yang digunakan dalam pembuatan media PDA sebagai zat pemadat.
* NaCl yaitu bahan yang digunakan untuk penelitian pengaruh kadar garam terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5.
* K2Cr2O7 yaitu bahan yang digunakan untuk penelitian pengaruh keberadaan logam berat Cr6+ terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5.
* Aquadest yaitu bahan yang digunakan untuk membuat media, membilas, membuat larutan stock dan lain sebagainya.
* HCl 0,1 M, 1 M, 3 M dan 5 M yaitu bahan yang digunakan untuk mengatur pH agar larutan semakin asam.
* NaOH 1,0112 M yaitu bahan yang digunakan untuk mengatur pH agar larutan semakin basa.

**3.2.3 Mikroorganisme yang Digunakan**

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur (*fungi*) *Trichoderma asperellum* TNC52 hasil isolasi dari tanah perkebunan coklat di Provinsi Riau. Jamur tersebut diperoleh dari koleksi Laboratorium Biokimia Universitas Riau *(culture collection)* dengan kode LBKURCC1.

* 1. **Penyiapan Substrat Pertumbuhan**

Media yang digunakan untuk pertumbuhan jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 adalah PDC (*Potato Dextrose Cair*) dan PDA (*Potato Dextrose Agar*). PDC (*Potato Dextrose Cair*) dan PDA (*Potato Dextrose Agar*) merupakan media yang paling banyak digunakan sebagai media pertumbuhan jamur ([*http://en.wikipedia.org*](http://en.wikipedia.org/)).

**3.3.1 PDA (*Potato Dextrose Agar*) ditambah zat warna CIRB5 Konsentrasi 100 mg/L**

Komposisi media agar terdiri dari :

* 200 gr Kentang yang telah diiris
* 20 gr Dextrose
* 15 gr BactoTM Agar
* 1000 mL Aquadest
* 0,1 gr serbuk CIRB5

Cara kerja pembuatan PDA (*Potato Dextrose Agar*) adalah sebagai berikut:

1. Masukkan kentang yang telah diiris halus kedalam gelas kimia 1000 mL kemudian tambahkan aquadest sebanyak 1000 mL.
2. Rebus irisan kentang diatas kompor listrik selama 1 jam (dihitung 1 jam setelah mendidih) dan volume aquadest dijaga konstan 1000 mL.
3. Saring, sehingga filtrat terpisah dari larutan.
4. Masukkan 20 gr dextrose, 15 gr BactoTM Agar dan 0,1 gr serbuk CIRB5 pada larutan kentang yang sudah disaring tadi kemudian aduk hingga larut.
5. Distribusikan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 mL dan tutup dengan kapas lemak, sterilkan dalam autoclave pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
6. Setelah steril tabung reaksi didiamkan hingga memadat dalam keadaan miring.
7. Simpan dalam kulkas dengan suhu ± 4oC sampai akan digunakan kembali.

**3.3.2 PDC (*Potato Dextrose Cair*)**

Komposisi media cair terdiri dari :

* 200 gr Kentang yang telah diiris
* 20 gr Dextrose
* 1000 mL Aquadest

Cara kerja pembuatan PDC (*Potato Dextrose Cair*) adalah sebagai berikut:

1. Masukkan kentang yang telah diiris halus kedalam gelas kimia 1000 mL kemudian tambahkan aquadest sebanyak 1000 mL.
2. Rebus irisan kentang diatas kompor listrik selama 1 jam (dihitung 1 jam setelah mendidih) dan volume aquadest dijaga konstan 1000 mL.
3. Saring, sehingga filtrat terpisah dari larutan.
4. Masukkan 20 gr dextrose pada larutan kentang yang sudah disaring tadi kemudian aduk hingga larut.
5. Distribusikan kedalam labu Erlenmeyer sesuai dengan percobaan yang akan dilakukan dan tutup dengan kapas lemak, sterilkan dalam autoclave pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

**3.4 Persiapan Penelitian**

**3.4.1 Pembuatan Larutan Stock Zat Warna CIRB5 Konsentrasi 1000 mg/L dengan Aquadest**

Zat warna yang digunakan pada penelitian ini adalah zat warna *Colour Index* *Reactive Blue 5* (CIRB5) yang diperoleh dari PT. Himalaya Tunas Texindo yang berlokasi di Jalan Cisirung Km 2 Mohammad Toha, Desa Cangkuang Wetan, Kecamatan Dayeuh Kolot, Kabupaten Bandung. Zat warna tersebut diperoleh dalam bentuk bubuk, kemudian dibuat limbah tekstil buatan (limbah artifisial).

Cara kerja Pembuatan Larutan Stock Zat Warna CIRB5 Konsentrasi 1000 mg/L dengan Aquadest adalah sebagai berikut :

* 1. Menyiapkan zat warna tekstil CIRB5 (dalam bentuk bubuk) yang akan ditimbang.
  2. Nyalakan *Neraca analitis* **DENVER INSTRUMENT COMPANY A-250** dan nolkan (menekan tombol tare).
  3. Letakkan kertas timbang pada neraca dan biarkan alat membaca berat kertas timbang tersebut, setelah itu nolkan (menekan tombol tare).
  4. Ambil zat warna CIRB5 dengan menggunakan spatula dan letakkan diatas kertas timbang yang telah berada pada neraca dan biarkan alat membaca berat zat warna sehingga didapatkan berat zat warna yang diinginkan. Dalam hal ini konsentrasi warna yang akan dibuat 1000 mg/L sehingga berat zat warna yang ditimbang adalah 1 gr.
  5. Setelah didapat berat zat warna yang diinginkan (1 gr), masukkan zat warna tersebut pada labu ukur 1000 mL dan bilas dengan aquadest zat warna yang masih tersisa pada kertas timbang sampai bersih.
  6. Tambahkan aquadest pada labu ukur hingga mencapai tanda batas.
  7. Homogenkan larutan tersebut dengan cara kocok sebanyak 20 kali hingga zat warna larut sempurna.

Konsentrasi limbah warna artifisial yang telah dibuat adalah 1000 mg/L atau 1000 ppm. Apabila akan membuat limbah tekstil artifisial dengan konsentrasi warna yang diinginkan, maka digunakan rumus pengenceran dibawah ini :

Rumus Pengenceran : V1 . K1 = V2 . K2

Dimana :

V1 = Volume kerja yang akan digunakan

V2 = Volume zat warna yang akan diambil dari larutan stock

K1 = Konsentrasi zat warna yang akan dibuat.

K2 = Konsentrasi zat warna pada larutan stock (1000 mg/L)

Larutan stock ini digunakan untuk labu kontrol zat warna yang dilarutkan dengan aquadest tanpa diberi jamur. Adapun contoh perhitungan mencari volume zat warna yang akan diambil dari larutan stock untuk labu kontrol zat warna yang dilarutkan dengan aquadest untuk percobaan dengan konsentrasi zat warna 60 mg/L adalah sebagai berikut :

**3.4.2 Pembuatan Larutan Stock Zat Warna CIRB5 Konsentrasi 1000 mg/L dengan PDC (*Potato Dextrose Cair*)**

Cara kerja Pembuatan Larutan Stok Zat Warna CIRB5 Konsentrasi 1000 mg/L dengan PDC (*Potato Dextrose Cair*) adalah sebagai berikut :

* 1. Menyiapkan zat warna tekstil CIRB5 (dalam bentuk bubuk) yang akan ditimbang.
  2. Nyalakan *Neraca analitis* **DENVER INSTRUMENT COMPANY A-250** dan nolkan (menekan tombol tare).
  3. Letakkan kertas timbang pada neraca dan biarkan alat membaca berat kertas timbang tersebut, setelah itu nolkan (menekan tombol tare).
  4. Ambil zat warna CIRB5 dengan menggunakan spatula dan letakkan diatas kertas timbang yang telah berada pada neraca dan biarkan alat membaca berat zat warna sehingga didapatkan berat zat warna yang diinginkan. Dalam hal ini konsentrasi warna yang akan dibuat 1000 mg/L sehingga berat zat warna yang ditimbang adalah 1 gr.
  5. Setelah didapatkan berat zat warna yang diinginkan (1 gr), masukkan zat warna tersebut pada larutan PDC (*Potato Dextrose Cair*) 1000 mL.
  6. Homogenkan larutan tersebut dengan cara kocok sebanyak 20 kali hingga zat warna larut sempurna.
  7. Konsentrasi limbah warna artifisial yang telah dibuat adalah 1000 mg/L atau 1000 ppm.

Larutan stock ini digunakan untuk labu kontrol yang berisi PDC (Potato Dextrose Agar) tanpa diberi jamur dan labu Erlenmeyer yang berisi jamur. Contoh penggunaan larutan stock ini untuk labu kontrol adalah untuk konsentrasi kontrol percobaan 60 mg/L maka komposisinya adalah 141 mL PDC ditambah dengan larutan stock zat warna CIRB5 sebanyak 9 mL sedangkan untuk labu Erlenmeyer yang berisi jamur untuk percobaan pH optimum konsentrasi 60 mg/L maka komposisinya adalah 15 mL inokulum jamur, 126 mL PDC dan 9 mL larutan stock zat warna CIRB5.

**3.4.3 Pembuatan Larutan Stock Cr6+ Konsentrasi 1000 mg/L**

Larutan stock Cr6+ akan digunakan pada percobaan pengaruh logam berat Cr6+ terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40oC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52.

Cara kerja pembuatan larutan stock Cr6+ Konsentrasi 1000 mg/Ladalah sebagai berikut :

1. Menyiapkan zat K2Cr2O7 (dalam bentuk bubuk) yang akan ditimbang.
2. Nyalakan *Neraca analitis* **DENVER INSTRUMENT COMPANY A-250** dan nolkan (menekan tombol tare).
3. Letakkan kertas timbang pada neraca dan biarkan alat membaca berat kertas timbang tersebut, setelah itu nolkan (menekan tombol tare).
4. Ambil serbuk K2Cr2O7 dengan menggunakan spatula dan letakkan diatas kertas timbang yang telah berada pada neraca dan biarkan alat membaca berat serbuk K2Cr2O7 sehingga didapatkan berat serbuk K2Cr2O7 yang diinginkan. Dalam hal ini konsentrasi Cr6+ yang akan dibuat 1000 mg/L sehingga berat serbuk K2Cr2O7 yang ditimbang adalah 4,125 gr. Perhitungan berat serbuk K2Cr2O7 sebesar 4,125 gr untuk menghasilkan Cr6+ dengan konsentrasi 1000 mg/L adalah sebagai berikut :
5. Setelah didapatkan berat serbuk K2Cr2O7 yang diinginkan (4,125 gr), masukkan serbuk K2Cr2O7 tersebut pada labu ukur 1000 mL dan bilas dengan aquadest serbuk K2Cr2O7 yang masih tersisa pada kertas timbang sampai bersih.
6. Tambahkan aquadest pada labu ukur hingga mencapai tanda batas.
7. Homogenkan larutan tersebut dengan cara kocok sebanyak 20 kali hingga serbuk K2Cr2O7 larut sempurna.
8. Konsentrasi Larutan Stock Cr6+ yang telah dibuat adalah 1000 mg/L atau 1000 ppm.

Adapun contoh perhitungan mencari volume larutan Cr6+ yang akan diambil dari larutan stock Cr6+ untuk menghasilkan konsentrasi 5 mg/L atau 5 ppm Cr6+ untuk penelitian pengaruh logam berat Cr6+ terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 oleh jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 adalah sebagai berikut :

**3.4.4 Aklimatisasi Jamur dengan Konsentrasi Zat Warna 10 Sampai 100 mg/L**

Aklimatisasi dilakukan dengan tujuan memberikan kesempatan pada jamur untuk menyesuaikan diri dengan limbah tekstil yang akan diolah. Konsentrasi warna yang diberikan adalah 10-100 mg/L dengan pertimbangan bahwa pemberian konsentrasi zat warna secara bertahap dapat mempercepat proses adaptasi jamur. Aklimatisasi dimulai dengan konsentrasi 10 mg/L, dengan cara kerja sebagai berikut :

* Percobaan dilakukan secara batch pada labu Erlenmeyer bervolume 250 mL.
* Menginokulasikan 10% (V/V) inokulum jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 yang berumur ± 24 jam pada limbah artifisial steril (PDC + zat warna) pada pH 4 pada volume kerja 150 mL.
* Menginkubasikan labu Erlenmeyer tersebut pada *shaker* **KOTTERMANN 4020** dan **TS-2000A VDRL SHAKER** dengan rotasi 100-125 rev/menit pada suhu kamar.
* Bila jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 telah tumbuh yang ditandai dengan pertumbuhan miselia jamur dalam jumlah yang relatif banyak maka pindahkan jamur tersebut ke labu Erlenmeyer untuk konsentrasi zat warna 20 mg/L dan lakukan hal yang sama hingga konsentrasi zat warna 100 mg/L.

Untuk komposisi zat warna (mL), inokulum jamur (mL) dan PDC (mL) dapat dilihat pada **Tabel 3.1** berikut ini.

**Tabel 3.1 Komposisi Inokulum Jamur, Larutan Stock CIRB5 dan PDC untuk Proses Aklimatisasi**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Konsentrasi warna**  **(mg/L)** | **Inokulum Jamur**  **(mL)** | **Larutan Stock CIRB5**  **(mL)** | **PDC**  **(mL)** |
| 10 | 15 | 1,5 | 133,5 |
| 20 | 15 | 3 | 132 |
| 30 | 15 | 4,5 | 130,5 |
| 40 | 15 | 6 | 129 |
| 50 | 15 | 7,5 | 127,5 |
| 60 | 15 | 9 | 126 |
| 70 | 15 | 10,5 | 124,5 |
| 80 | 15 | 12 | 123 |
| 90 | 15 | 13,5 | 121,5 |
| 100 | 15 | 15 | 120 |

*Sumber : Brahmanto, 2006*

3.4.5 Membuat Kurva Kalibrasi Zat Warna CIRB5

Pembuatan kurva kalibrasi bertujuan untuk mencari persamaan garis dimana Y adalah nilai absorban (A) dan X adalah konsentrasi zat warna (mg/L). Sebelum melakukan pemeriksaan konsentrasi warna yang akan digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi maka terlebih dahulu harus ditentukan panjang gelombang dari zat warna CIRB5 itu sendiri. Pencarian panjang gelombang untuk zat warna CIRB5 dilakukan dengan menggunakan alat *UV Vis Scan Spektrofotometer* *(Nugroho et al., 2002)*. Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa panjang gelombang absorbansi maksimum warna CIRB5 yang didapat yaitu 608 nm, tetapi karena kemampuan alat *spektrofotometer* **MERCK SQ 118** yang digunakan pada penelitian ini tidak bisa digunakan untuk panjang gelombang 608 nm maka untuk mengukur konsentrasi warna CIRB5 digunakan panjang gelombang 585 nm.



Marked Wavelengths

Reg A : L 228 = 2.9447

Reg A : L 248 = 2.9112

Reg A : L 608 = 0.95563

**Gambar 3.2 Panjang Gelombang Absorbsi Maksimum Untuk CIRB5**

*(Nugroho et al., 2002)*

Kemudian dengan menggunakan panjang gelombang 585 nm maka dibuat kurva kalibrasi dengan rentang konsentrasi 10 - 100 mg/L.

Cara pembuatan kurva kalibrasi zat warna *Colour Index Reactive Blue 5* (CIRB5)adalah sebagai berikut:

* + Buat larutan dengan konsentrasi zat warna dari 10 - 100 mg/L yang diambil dari larutan stock zat warna CIRB5.
  + Nyalakan *spektrofotometer* **MERCK SQ 118**, diamkan ± 15 menit.
  + Masukkan larutan blanko (aquadest) ke dalam sel hingga diperoleh nilai absorban 0,000.
  + Ganti larutan blanko dengan larutan zat warna *Colour Index Reactive Blue 5* (CIRB5) konsentrasi 10 hingga 100 mg/L dan bacalah nilai absorbannya pada masing-masing konsentrasi.
  + Plotkan nilai absorban terhadap konsentrasi, sehingga didapat nilai persamaan garisnya.
  + Nilai persamaan garis dianggap valid apabila memiliki nilai R2 (Koefisien determinasi) yang mendekati satu.

Nilai persamaan garis yang didapat dari kurva kalibrasi zat warna *Colour Index Reactive Blue 5* (CIRB5) akan digunakan untuk penentuan konsentrasi zat warna dari penelitian yang akan dilakukan.

**3.5 Penelitian Pendahuluan**

3.5.1 Penentuan Nilai pH Optimum dengan Variasi pH (3, 4 dan 5) untuk Proses Penyisihan Zat Warna CIRB5 pada Berbagai Konsentrasi Zat Warna (60, 80 dan 100 mg/L) oleh Jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada suhu kamar/ruang (ambien)

* Percobaan dilakukan secara batch pada labu Erlenmeyer bervolume 250 mL.
* Menginokulasikan 10% (V/V) inokulum jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 yang berumur ± 24 jam pada limbah artifisial steril (PDC + zat warna) dengan variasi konsentrasi zat warna 60, 80 dan 100 mg/L serta variasi pH 3, 4 dan 5 pada volume kerja 150 mL.
* Menginkubasikan labu Erlenmeyer tersebut pada *shaker* **KOTTERMANN 4020** dan **TS-2000A VDRL SHAKER** dengan rotasi 100-125 rev/menit pada suhu kamar selama 72 jam.
* Melakukan pengambilan sampel setiap 6 jam.
* Percobaan dilakukan secara triplo.
* Parameter yang diperiksa adalah VSS dan konsentrasi zat warna
* Membuat 2 labu kontrol yang berisi limbah artifisial zat warna CIRB5 tanpa inokulum jamur yang dilarutkan dengan aquadest dan limbah artifisial zat warna CIRB5 tanpa inokulum jamur yang dilarutkan dengan PDC (*Potato Dextrose Cair*).

**3.6 Penelitian Utama**

Penelitian utama yang akan dilakukan adalah proses pengolahan limbah tekstil artifisial dengan zat warna *Colour Index Reactive Blue 5* (CIRB5) pada suhu 40oC pada variasi konsentrasi tertentu oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 yang dilakukan secara batch pada labu Erlenmeyer bervolume 250 mL dengan volume kerja 150 mL. Menginkubasikan labu Erlenmeyer tersebut pada *Waterbath shaker* dengan laju pengadukan 100-125 rpm selama 72 jam pada suhu 40oC. Penelitian utama dilakukan setelah persiapan yang berupa pembuatan larutan stock Zat Warna CIRB5 konsentrasi 1000 mg/L dengan aquadest, pembuatan larutan stock Zat Warna CIRB5 konsentrasi 1000 mg/L dengan PDC, pembuatan larutan stock Cr6+ konsentrasi 1000 mg/L, aklimatisasi jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 hingga konsentrasi zat warna 100 mg/L, pembuatan kurva kalibrasi zat warna CIRB5 serta percobaan pendahuluan untuk mengetahui pH optimum bagi pertumbuhan jamur selesai dilakukan.

Adapun penelitian utama yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Mengamati pengaruh umur jamur muda (fase logaritmik) *Trichoderma asperellum* TNC52 terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan.
2. Mengamati pengaruh umur jamur tua (fase stationer) *Trichoderma asperellum* TNC52 terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan.
3. Mengamati pengaruh lingkungan (asin)/kehadiran 1% NaCl terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan.
4. Mengamati pengaruh 5 mg/L logam berat Cr6+ terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan.
5. Pemeriksaan sampel penelitian dengan menggunakan alat *UV-Vis Spektrofotometer* Mini 1240 SHIMADZU.

3.6.1 Mengamati pengaruh umur jamur muda (*fase logaritmik*) *Trichoderma asperellum* TNC52 terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan

* Percobaan dilakukan secara batch pada labu Erlenmeyer bervolume 250 mL.
* Menginokulasikan 10% (V/V) inokulum jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 yang berumur ± 24 jam pada media PDC steril tanpa zat warna dengan pH diatur sesuai dengan nilai pH optimum pada volume kerja 150 mL.
* Menginkubasikan labu Erlenmeyer tersebut pada *Waterbath shaker* dengan rotasi 100-125 rev/menit pada suhu 40oC hingga jamur mencapai fase logaritmik (waktu yang dibutuhkan jamur untuk mencapai fase logaritmik ditentukan dengan melihat grafik pertumbuhan (VSS) pada percobaan penentuan pH optimum).
* Menambahkan kedalam labu Erlenmeyer yang ada pertumbuhan jamur tersebut, zat warna CIRB5 dengan variasi konsentrasi (60, 80 dan 100 mg/L).
* Menginkubasikan kembali dalam *Waterbath shaker* pada suhu 40oC dengan rotasi 100-125 rev/menit selama 72 jam.
* Melakukan pengambilan sampel setiap 6 jam.
* Percobaan dilakukan secara triplo.
* Parameter yang diperiksa adalah VSS dan konsentrasi zat warna.
* Membuat 2 labu kontrol yang berisi limbah artifisial zat warna CIRB5 yang dilarutkan dengan aquadest tanpa inokulum jamur dan limbah artifisial zat warna CIRB5 yang dilarutkan dengan PDC (*Potato Dextrose Cair*) tanpa inokulum jamur.

3.6.2 Mengamati pengaruh umur jamur tua (*fase stationer*) *Trichoderma asperellum* TNC52 terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan

* Percobaan dilakukan secara batch pada labu Erlenmeyer bervolume 250 mL.
* Menginokulasikan 10% (V/V) inokulum jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 yang berumur ± 24 jam pada media PDC steril tanpa zat warna dengan pH diatur sesuai dengan nilai pH optimum pada volume kerja 150 mL.
* Menginkubasikan labu Erlenmeyer tersebut pada *Waterbath shaker* dengan rotasi 100-125 rev/menit pada suhu 40oC hingga jamur mencapai fase stationer (waktu yang dibutuhkan jamur untuk mencapai fase stationer ditentukan dengan melihat grafik pertumbuhan (VSS) pada percobaan penentuan pH optimum).
* Menambahkan kedalam labu Erlenmeyer yang ada pertumbuhan jamur tersebut, zat warna CIRB5 dengan variasi konsentrasi (60, 80 dan 100 mg/L).
* Menginkubasikan kembali dalam *Waterbath shaker* pada suhu 40oC dengan rotasi 100-125 rev/menit selama 72 jam.
* Melakukan pengambilan sampel setiap 6 jam.
* Percobaan dilakukan secara triplo.
* Parameter yang diperiksa adalah VSS dan konsentrasi zat warna.
* Membuat 2 labu kontrol yang berisi limbah artifisial zat warna CIRB5 yang dilarutkan dengan aquadest tanpa inokulum jamur dan limbah artifisial zat warna CIRB5 dilarutkan dengan PDC (*Potato Dextrose Cair*) tanpa inokulum jamur.

3.6.3 Mengamati pengaruh lingkungan (asin)/kehadiran 1% NaCl terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan

* Percobaan dilakukan secara batch pada labu Erlenmeyer bervolume 250 mL.
* Menginokulasikan 10% (V/V) inokulum jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 yang berumur ± 24 jam pada limbah artifisial yang terdiri dari CIRB5 dengan konsentrasi 60, 80 dan 100 mg/L + 1% (b/v) NaCl dengan pH diatur sesuai dengan nilai pH optimum pada volume kerja 150 mL.
* Menginkubasikan labu Erlenmeyer tersebut pada *Waterbath shaker* dengan rotasi 100-125 rev/menit pada suhu 40oC selama 72 jam.
* Melakukan pengambilan sampel setiap 6 jam.
* Percobaan dilakukan secara triplo.
* Parameter yang diperiksa adalah VSS dan konsentrasi zat warna.
* Membuat 2 labu kontrol yang berisi limbah artifisial zat warna CIRB5 dan garam NaCl yang dilarutkan dengan aquadest tanpa inokulum jamur dan limbah artifisial zat warna CIRB5 dan garam NaCl yang dilarutkan dengan PDC (*Potato Dextrose Cair*) tanpa inokulum jamur.

3.6.4 Mengamati pengaruh 5 mg/L logam berat Cr6+ terhadap proses penyisihan zat warna CIRB5 pada suhu 40ºC oleh jamur hidup *Trichoderma asperellum* TNC52 pada pH optimum yang ditentukan dari penelitian pendahuluan

* Percobaan dilakukan secara batch pada labu Erlenmeyer bervolume 250 mL.
* Menginokulasikan 10% (V/V) inokulum jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 yang berumur ± 24 jam pada limbah artifisial yang terdiri dari CIRB5 dengan konsentrasi 60, 80 dan 100 mg/L + 5 mg/L Cr6+ dengan pH diatur sesuai dengan nilai pH optimum pada volume kerja 150 mL.
* Menginkubasikan labu Erlenmeyer tersebut pada *Waterbath shaker* dengan rotasi 100-125 rev/menit pada suhu 40oC selama 72 jam.
* Melakukan pengambilan sampel setiap 6 jam.
* Percobaan dilakukan secara triplo.
* Parameter yang diperiksa adalah VSS dan konsentrasi zat warna.
* Membuat 2 labu kontrol yang berisi limbah artifisial zat warna CIRB5 dan logam Cr6+ yang dilarutkan dengan aquadest tanpa inokulum jamur dan limbah artifisial zat warna CIRB5 dan logam Cr6+ yang dilarutkan dengan PDC (*Potato Dextrose Cair*) tanpa inokulum jamur.

3.6.5 Pemeriksaan sampel penelitian dengan menggunakan alat *UV-Vis Spektrofotometer* Mini 1240 SHIMADZU

Pemeriksaan sampel penelitian dengan menggunakan alat *UV-Vis Spektrofotometer* SHIMADZU dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia (UPI). Adapun langkah-langkah untuk memeriksa sampel dengan menggunakan alat *UV-Vis Spektrofotometer* SHIMADZU adalah sebagai berikut :

* Sampel jamur yang diinkubasi dalam labu Erlenmeyer selama 72 jam serta blanko (PDC + zat warna) dari percobaan pH optimum (pH 3,4 dan 5) dan sampel blanko (PDC + zat warna) untuk percobaan pengaruh lingkungan (asin)/kehadiran garam, dan pengaruh logam berat Cr6+ diambil sebanyak 5 mL.
* Sampel tersebut disentrifugasi untuk memisahkan padatan dan cairan.
* Cairan yang telah terpisah dari padatan dimasukkan ke dalam ampul.
* Sampel cairan tersebut kemudian diperiksa dengan menggunakan alat *UV-Vis Spektrofotometer* **SHIMADZU*.***Adapun cara pemeriksaan dengan menggunakan alat *UV-Vis Spektrofotometer* **SHIMADZU** adalah sebagai berikut :

1. Pilihlah mode menu 2 (spectrum) dengan menekan tombol 2. Masukkan data pengukuran yang diinginkan dengan cara menekan tombol (angka) 1 s/d 6.
2. Masukkan larutan blanko kemudian tekan F1 untuk koreksi “baseline”, tunggu sampai scanning berhenti (3x).
3. Masukkan larutan sampel, kemudian tekan tombol “auto zero”, lalu tekan tombol “Start”. (Proses Scanning akan berlangsung)

Print out spectra dengan menekan tombol “print”.

1. Tekan tombol F2 untuk melihat λ maks kemudian Print out spectra dengan menekan tombol “print”.

**3.7 Analisa Parameter atau Data Untuk Masing-masing Percobaan**

* Menghitung efisiensi penyisihan warna (dalam %) untuk masing-masing percobaan.
* Mengamati hubungan antara penyisihan zat warna CIRB5 dengan VSS dan pH terhadap waktu (dengan grafik).
* Mengamati hubungan antara penyisihan zat warna CIRB5 dengan umur biakan, baik pada *fase logaritmik* maupun *fase stationer* (dengan grafik).
* Mengamati pengaruh adanya 1% NaCl terhadap penyisihan zat warna CIRB5 (dengan grafik).
* Mengamati pengaruh adanya 5 mg/L logam berat (Cr6+) terhadap penyisihan zat warna CIRB5 (dengan grafik).
* Memplotkan pada bagian linear grafik ln(C/Co) terhadap fungsi waktu t dimana C adalah konsentrasi zat warna CIRB5 yang tertinggal pada waktu t dan Co adalah konsentrasi awal zat warna CIRB5. Hasil plot akan memperoleh k (yang merupakan konstanta laju penyisihan), dimana k tergantung pada faktor abiotis dan faktor biotis. Kemudian menghitung k untuk masing-masing percobaan.

**3.7.1 Parameter yang Diukur/Dihitung**

Pengambilan sampel dilakukan setiap 6 jam dan dilakukan pemeriksaan secara triplo (tiga sampel dalam satu kali pemeriksaan) agar diperoleh data yang akurat. Parameter yang diukur/dihitung dalam percobaan ini meliputi *Volatile Suspended Solid* (VSS), konsentrasi zat warna, persentase penyisihan warna dan laju penyisihan.

* + - 1. ***Volatile Suspended Solid* (VSS)**

VSS merupakan parameter yang menunjukkan jumlah padatan organik dalam air limbah yang dapat menguap pada suhu tinggi (600oC). Pengukuran VSS ini untuk mengetahui pertumbuhan mikroorganisme pada berbagai kondisi pengolahan. Pengukuran yang dilakukan untuk konsentrasi biomassa tersuspensi dilakukan dengan metoda gravimetri menggunakan standar method.

Cara kerja pengukuran VSS :

1. Cawan krus kosong sebelum digunakan terlebih dahulu dicuci sampai bersih.
2. Sterilkan pada oven 105oC **INTERNATIONAL** sampai kering.
3. Ambil 12 mL sampel, sentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit agar diperoleh endapan yang baik. Kemudian endapan tersebut dimasukkan kedalam cawan krus kosong yang sudah steril.
4. Cawan tersebut dikeringkan dalam oven 105oC **INTERNATIONAL** sampai mencapai berat konstan. Kemudian didinginkan dalam desikator untuk menstabilkan berat dan temperatur dan menimbang beratnya

(a gram).

1. Cawan yang telah ditimbang tersebut dimasukkan kedalam oven 600oC **NEY M-525 SERIES II** selama 2 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan menimbang beratnya (b gram).

Rumus perhitungan :

Dimana :

a = berat cawan sebelum pengabuan (oven 105oC), gram.

b = berat cawan setelah pengabuan (oven 600oC), gram.

* + - 1. **Konsentrasi Zat Warna**

Konsentrasi warna diukur dengan *spektrofotometer* **MERCK SQ 118** dengan panjang gelombang 585 nm sehingga didapat nilai absorbannya. Sampel yang akan diperiksa konsentrasi warnanya sebelumnya disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Sentrifugasi dilakukan agar terjadi pemisahan antara cairan dengan padatan organik sehingga hasil yang diukur merupakan konsentrasi warna yang sesungguhnya. Setelah proses sentrifugasi selesai, cairan digunakan untuk mengukur konsentrasi warna sedangkan padatan organik yang mengendap digunakan untuk mengukur VSS. Konsentrasi warna dibaca sebagai absorban yang selanjutnya dikonversikan dalam satuan mg/L dengan menggunakan persamaan regresi linier yang ditentukan dari kurva kalibrasi zat warna CIRB5.

Adapun cara kerja penggunaan *spektrofotometer* **MERCK SQ 118** adalah sebagai berikut :

1. Nyalakan *spektrofotometer* **MERCK SQ 118,** diamkan ± 15 menit.
2. Masukkan larutan blanko (aquadest) ke dalam sel hingga diperoleh nilai absorban 0,000.
3. Ganti larutan blanko dengan sampel yang akan diukur dan bacalah nilai absorbannya pada masing-masing konsentrasi.
   * + 1. **Persen Penyisihan Warna**

Persen penyisihan warna (*decolorisasi*) ditentukan mula-mula dengan mengukur absorban dari sampel pada panjang gelombang 585 nm dengan alat *spektrofotometer* **MERCK SQ 118**. Nilai absorban yang diperoleh dari sampel yang telah diukur kemudian dikonversi dalam satuan mg/L dengan menggunakan persamaan regresi linier yang ditentukan dari kurva kalibrasi zat warna CIRB5. Setelah diperoleh nilai konsentrasi terukur, nilai tersebut kemudian dimasukkan dalam perhitungan. Adapun perhitungan dari persen penyisihan warna adalah sebagai berikut :

% penyisihan warna

Contoh perhitungan :

* Konsentrasi awal (jam ke-0) = 60 mg/L
* Konsentrasi terukur (jam ke-6) = 53 mg/L

% Penyisihan warna adalah

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut maka diketahui bahwa % penyisihan warna pada jam ke-6 adalah sebesar 11,67 %.

* + - 1. **Laju Penyisihan (k)**

Laju penyisihan (k) untuk penelitian ini menggunakan kinetika reaksi orde 1 dimana perhitungan konstanta laju penyisihan (k) dilakukan dengan cara memplotkan data hasil percobaan yang dilakukan pada grafik ln(C/Co) terhadap fungsi waktu t dimana C adalah konsentrasi zat warna CIRB5 yang terukur pada waktu t dan Co adalah konsentrasi awal zat warna CIRB5. Hasil plot akan memperoleh konstanta laju penyisihan (k). Berdasarkan cara perhitungan konstanta laju penyisihan yang dilakukan oleh *Sumathi & Manju,* (*2000*), dimana perhitungan konstanta laju penyisihan hanya dilakukan terhadap data konsentrasi zat warna yang linear.