

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. JENIS PENELITIAN

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta ada kontrol (Nasir, 1999). Penelitian Ini dilakukan untuk mengetahui sensitifitas parameter tabel kehidupan *Daphnia magna* terhadap pentaklorofenol melalui uji hayati kronis *Daphnia magna*.

##### B. DESAIN PENELITIAN

Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 perlakuan dan satu kontrol, dengan 10 kali pengulangan untuk masing-masing perlakuan. Jumlah pengulangan ditentukan berdasarkan perhitungan menurut Kemas (1995) dengan rumus matematik:

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

Ket : t = perlakuan/treatment

r = pengulangan / replikasi

15 = faktor nilai derajat kebebasan

Berdasarkan rumus diatas, untuk 3 perlakuan diperoleh jumlah replikasi lebih besar atau sama dengan 8,5 yang digenapkan menjadi 10 kali pengulangan. Perlakuan kontrol digunakan medium *freshwater* yaitu air aquades yang telah ditambah nutrisi (*fresh water*) dengan konduktivitas 300

$\mu\text{S/cm}$ . Air pengencer yang digunakan adalah air aquades yang ditambah nutrisi (*fresh water*). Volume total larutan uji per beaker gelas adalah 40 ml dan *Daphnia magna* yang digunakan berumur kurang dari 24 jam (disebut juga neonate) dengan jumlah *Daphnia magna* perbeaker gelas adalah 1 ekor.

### C. PROSEDUR KERJA

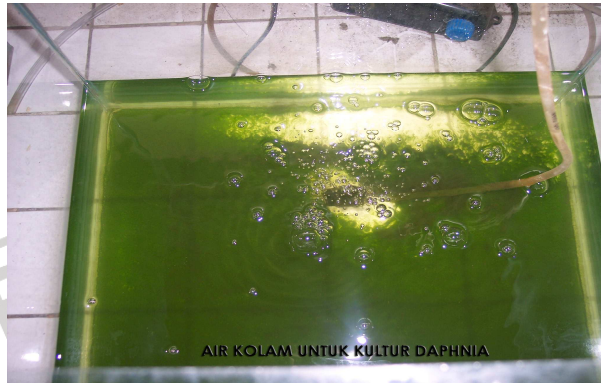
Prosedur kerja terdiri dari beberapa kegiatan yaitu: Persiapan pengkulturan *Daphnia magna*, pembuatan medium *freshwater*, pelaksanaan penelitian yang meliputi *range finding test*, *definitive test*, dan uji hayati kronis.

#### 1. Pengkulturan *Daphnia magna*

Pengkulturan *Daphnia magna* dilakukan di laboratorium biologi BBPK. Tujuannya adalah untuk pengadaptasian *Daphnia* dengan kondisi lingkungan laboratorium biologi BBPK dan untuk memperoleh induk *Daphnia* dewasa yang siap menghasilkan neonate. Medium kultur yang digunakan adalah air kolam karena air kolam mengandung mikroalga yang merupakan makanan alami *Daphnia magna* dan diambil dari Laboratorium Ekologi ITB karena diasumsikan air kolam tersebut tidak tercemar oleh zat toksik (merupakan medium kultur *Daphnia* yang digunakan di laboratorium Ekologi ITB).

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pengkulturan *Daphnia magna* adalah:

- a. Air kolam sebagai medium kultur *Daphnia* dimasukkan kedalam akuarium ukuran 30 L sebanyak 15 L



**Gambar 3.1** Air kolam yang digunakan sebagai medium kultur *Daphnia magna*

- b. *Daphnia magna* dimasukkan ke dalam akuarium, aerasi kultur tersebut dengan volume aerasi yang kecil, tujuannya adalah untuk pengadaptasian *Daphnia magna* dalam kondisi laboratorium BBPK dan untuk memastikan diperolehnya *Daphnia magna* dewasa yang siap bertelur.



**Gambar 3.2** Pengkulturan *Daphnia magna* pada medium kultur air kolam dengan aerasi

- c. Kultur *Daphnia* diberi makan air beras setiap 2 hari sekali sebanyak 50 ml atau sesuai dengan kondisi *Daphnia* (jumlah). Air beras yang digunakan adalah beras yang dicuci dengan aquades.



**Gambar 3.3** Air beras yang digunakan sebagai pakan kultur *Daphnia magna*

- d. Kultur disimpan ditempat yang tidak terkena cahaya matahari langsung.
- e. Penggantian air kultur dilakukan setiap 2 minggu sekali atau sesuai kebutuhan/kondisi.

## 2. Pembuatan medium *Freshwater*

- a. Bahan yang digunakan untuk membuat medium freshwater buatan (medium EPA) adalah:
- 0,096 g  $\text{NaHCO}_3$
- 0,06 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,06 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,004 g KCl

Masing-masing bahan dilarutkan dalam 1 L aquades. Jika sulit untuk dilarutkan maka menggunakan magnetik stirrer

- b. *Fresh water* diaerasi terlebih dahulu dengan menggunakan aerator sebelum digunakan dalam larutan uji ataupun kontrol, setidaknya 0,5 jam sebelum digunakan (EPS, 1990).
- c. Dilakukan pengukuran pH, DO, konduktivitas. Freshwater dengan komposisi tersebut memiliki konduktivitas 400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Kondisi normal yang dibutuhkan untuk mengkultur *Daphnia* adalah dengan  $\text{pH} > 7,4$  (kekeruhan  $\geq 80 \text{ mg/L}$ ) dan DO tidak kurang dari 60% kandungan udara jenuh (EPS, 1990).

### 3. Pelaksanaan penelitian

Sebelum melakukan uji hayati kronis, dilakukan penentuan rentang konsentrasi yang digunakan dalam pengujian toksisitas kronis melalui penentuan LC50 dengan menggunakan *range finding test* dan *definitive test*.

#### a. *Range Finding Test*

*Range finding test* merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui batas kritis (*critical range*) konsentrasi, yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian terbesar mendekati 50% dan kematian terkecil mendekati 50%. Langkah-langkah yang dilakukan untuk melakukan uji pendahuluan adalah:

- 1) Membuat larutan *stock* pentaklorofenol murni 4,5 ppm sebanyak 500 ml, dengan pelarut aquades

- 2) Lakukan pengenceran larutan induk pentaklorofenol (4,5 ppm) dengan memasukkan larutan tersebut ke dalam beaker gelas ukuran 250 ml sebanyak “x” (sesuai konsentrasi larutan encer yang diinginkan) , kemudian beaker gelas tersebut diisi *fresh water* sampai volumenya 200 ml. Besarnya “x” diperoleh dengan rumus pengenceran:

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

Ket:  $M_1$  = Konsentrasi larutan pekat  
 $V_1$  = volume larutan pekat (x)  
 $M_2$  = Konsentrasi larutan encer  
 $V_2$  = Volume larutan encer

Konsentrasi awal yang digunakan dalam *range finding test* adalah 300 ppb, 600 ppb, 900 ppb, 1200 ppb, dan 1500 ppb.

- 3) Induk *Daphnia magna* yang siap melahirkan dipindahkan dari medium akuarium ke dalam beaker gelas ukuran 100 ml yang sudah diisi freshwater dengan konduktifitas 300  $\mu\text{S}/\text{cm}$  , maksimal 24 jam sebelum penelitian, tujuannya agar dihasilkan neonate berumur  $\leq 24$  jam.



**Gambar 3.4** Pemisahan induk *Daphnia magna* hamil ke dalam beaker gelas ukuran 100 ml yang sudah diisi *fresh water*



- 4) Larutan dari masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam gelas piala ukuran 100 ml sebanyak 40 ml, dilakukan pengulangan 5 kali
- 5) *Daphnia magna* berumur  $\leq 24$  jam yang telah dikultur dalam freshwater dimasukkan ke dalam gelas piala sebanyak 10 neonate per gelas piala
- 6) Pengamatan dilakukan selama 48 jam, dengan mengamati mortalitas *Daphnia* pada jam jam pertama, jam ke-24 dan jam ke-48, tanpa pemberian makan dan aerasi
- 7) Dilakukan pengukuran faktor fisika kimia (pH, DO, konduktivitas, dan suhu) dalam setiap pengamatan
- 8) Rentang konsentrasi dari uji pendahuluan (*Range finding test*) yang menyebabkan kematian terbesar mendekati 50% dan kematian terkecil mendekati 50%, akan digunakan dalam "*Definitive test*"

**b. Melakukan uji penentuan "*Definitive test*"**

*Definitive test* adalah uji penentuan  $LC_{50}$ . konsentrasi yang digunakan dalam *definitive test* adalah konsentrasi hasil *range finding test* yang diperlebar kisaran konsentrasinya dalam rasio yang sama.

Langkah-langkah yang dilakukan dalam uji penentuan adalah:

- 1) Tahapan awal sama dengan "*Range finding test*", dengan rentang konsentrasi pengenceran yang diperoleh berdasarkan hasil *Range finding test*.

- 2) Pengamatan mortalitas *Daphnia magna* dilakukan selama 48 jam setiap 12 jam sekali (tiga jam pertama, jam ke-12, jam ke-48) tanpa pemberian makan dan aerasi.
- 3) Dilakukan pengukuran faktor fisika kimia yaitu pH, DO, konduktivitas, dan suhu dalam setiap pengamat

**c. Uji Hayati Kronis**

Konsentrasi larutan uji yang digunakan dalam uji hayati kronis diperoleh dari hasil *definitive test*. Dari hasil *definitive test* diperoleh nilai  $LC_{50}$  24 jam dan 48 jam melalui analisis Polo Probit (*software* 1987). Rentang konsentrasi yang digunakan dalam uji hayati kronis adalah kisaran konsentrasi aman atau NOEC yang diperoleh dari rumus (Forbes, *et al.*, 1994):

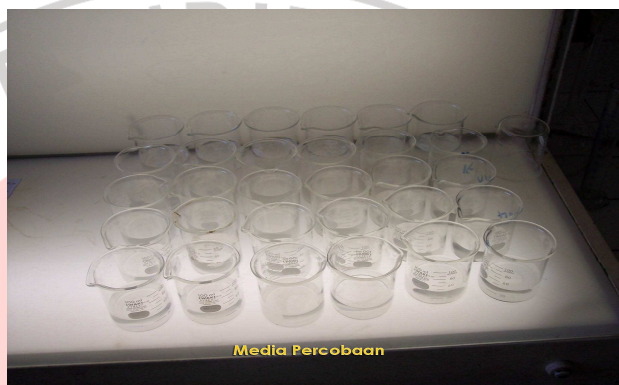
$$NOEC = 0.052(LC50)^{0.95}$$

Berdasarkan hasil dari rumus, maka ditentukan rentang konsentrasi uji hayati kronis dengan faktor kelipatan sepuluh (OECD 202, 1984). Setelah menentukan kisaran konsentrasi uji hayati kronis, langkah-langkah yang dilakukan adalah:

- a. *Daphnia magna* dalam aquarium yang siap melahirkan, dikultur di gelas piala 100 ml (5 buah) dengan menggunakan *freshwater* yang memiliki konduktivitas 300  $\mu\text{S}/\text{cm}$
- b. Pengkulturan ini dilakukan maksimal 24 jam sebelum penelitian tanpa pemberian makan



- c. Masing-masing konsentrasi larutan uji pentaklorofenol yang telah ditentukan, dimasukkan kedalam gelas piala ukuran 100 ml sebanyak 40 ml. Masing-masing konsentrasi 10 replikasi.
- d. Neonate berumur  $\leq 24$  jam yang dihasilkan pada tiap kultur, dimasukkan ke masing-masing gelas piala sebanyak 1 ekor



**Gambar 3.5** Gelas piala ukuran 100 ml sebanyak 40 buah yang ditempatkan pada meja percobaan

- e. Kegiatan harian yang dilakukan selama penelitian adalah:
  - 1) Induk dipindahkan dari gelas piala sebelumnya sekaligus memisahkan dari neonate-neonate yang diproduksinya pada tiap gelas piala ke gelas piala lain yang telah diisi dengan sampel air sama yang baru (belum digunakan). Pemindahan menggunakan pipet yang ukuran lubangnyanya telah dimodifikasi sehingga ukurannya lebih besar dari ukuran induk yang dipindahkan atau menggunakan bagian bawah mikropipet. Neonate-neotnate yang dihasilkan, tidak disatukan kembali dengan induknya.

- 2) Kultur uji hayati kronis diberi makan berupa air beras sebanyak 0,1 ml per beaker gelas setiap hari
- 3) Dilakukan pengukuran pH dan suhu pada masing-masing beaker gelas setiap hari



**Gambar 3.6** Pengukuran konduktivitas kultur sampel larutan uji

- 4) Pengukuran DO dilakukan pada awal dan akhir pergantian larutan uji dalam tiga kali pengamatan dan pengukuran konduktivitas dilakukan dalam tiga kali pengamatan
- 3) Neonate-neonate yang telah terpisah dari induknya pada setiap gelas piala dihitung jumlahnya, kemudian dihitung jumlah rata-rata dari jumlah induk yang masih hidup ( $m_x$ ).
- 3) Dilakukan perhitungan proporsi induk yang masih hidup dari jumlah replikasi yang dilakukan ( $I_x$ )
- 4) Jumlah induk yang lulus hidup dan jumlah neonate yang dihasilkan dicatat dalam tabel pengamatan (Tabel 3.5).
- 5) Pengamatan  $m_x$  dan  $I_x$  dilakukan setiap hari dan dicatat pada tabel pengamatan (Tabel 3.6) dengan durasi waktu per hari

#### D. TEKNIK PENGOLAHAN DATA

Data yang diperoleh adalah jumlah neonate dan jumlah induk yang hidup per hari. Dari data tersebut akan dihitung, jumlah neonate yang dihasilkan dalam setiap konsentrasi larutan uji dan kontrol, kelulushidupan (*survivorship*,  $I_x$ ), umur siklus hidup, rata-rata fekunditas harian (*age specific fecundity*,  $m_x$ ), laju reproduktif bersih (*net reproductive rate*,  $R_0$ ), periode hidup rata-rata (*mean generation time*,  $T$ ), rata-rata pertumbuhan populasi (*rate of increase*,  $r_m$ ), rata-rata kecepatan pertumbuhan populasi (*finite rate of increase*,  $\lambda$ ).

Semua data disajikan dalam tabel kehidupan lalu ditransformasi kedalam bentuk grafik untuk dianalisis secara deskriptif, dengan data hasil pengukuran faktor fisik kimia sebagai data pendukung. Pengolahan data untuk mengetahui signifikansi pengaruh pentaklorofenol terhadap beberapa parameter tabel kehidupan *Daphnia magna* adalah menggunakan uji statistik dengan metode One Way ANOVA (SPSS 13.0) dengan  $p < 0,05$ . Parameter  $I_x$ ,  $m_x$ ,  $r_m$ , lamda dihitung pada hari ke-21 (OECD 202). Berdasarkan Sorensen (1996), rumus-rumus tabel kehidupan yang digunakan untuk menghitung  $I_x$ ,  $m_x$ , dan  $R_0$  adalah:

$$I_x = \frac{\text{jumlah induk yang hidup}}{\text{Jumlah induk awal}} \times 100\%$$

$$m_x = \frac{\text{Jumlah neonate}}{\text{Jumlah induk yang hidup}}$$

$$R_0 = \sum_{x=1}^n I_x m_x$$

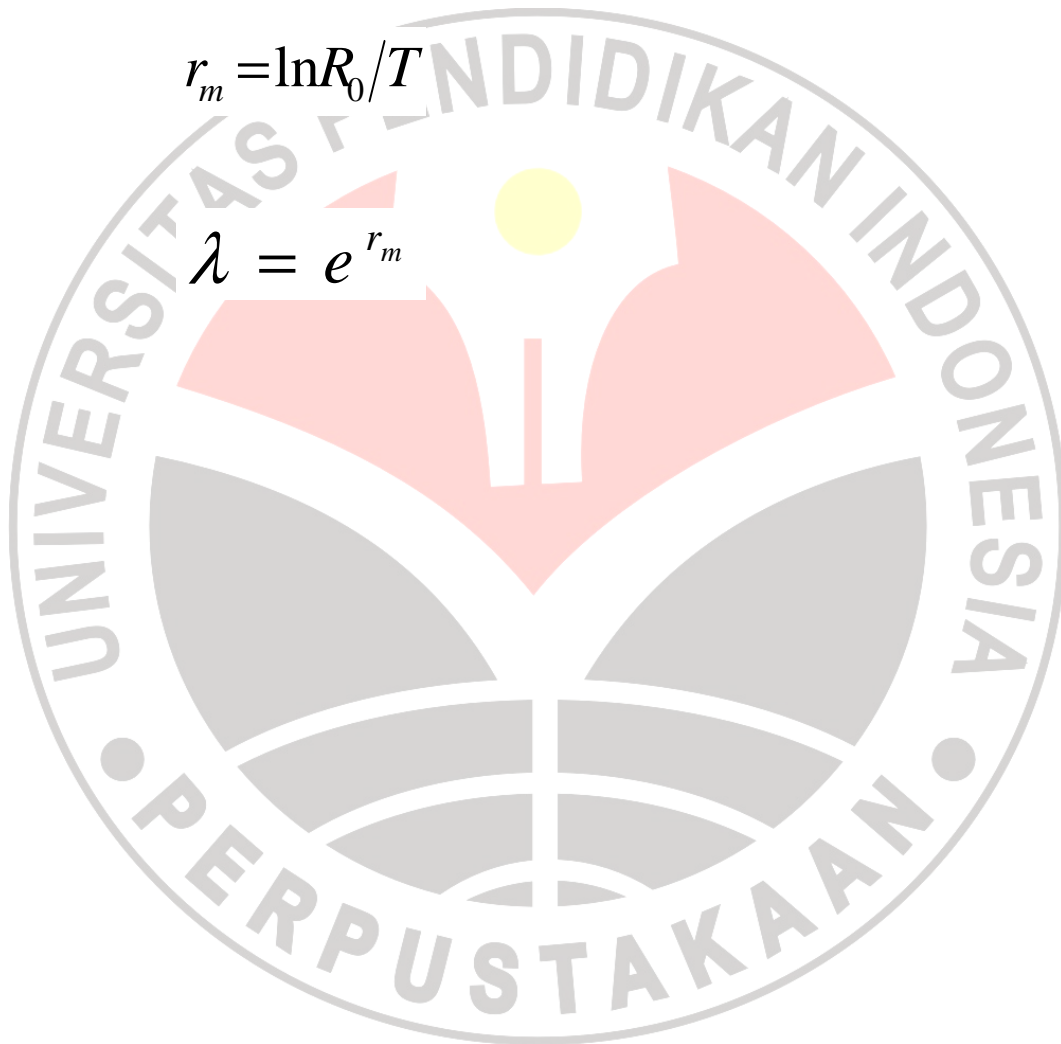
Berdasarkan Odum (1971), rumus-rumus untuk menghitung  $T$ ,  $r_m$ , dan

$\lambda$  adalah:

$$T = \frac{\sum X \times I_x \times m_x}{\sum I_x \times m_x}$$

$$r_m = \ln R_0 / T$$

$$\lambda = e^{r_m}$$



**E. ALUR PENELITIAN**