

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, karena pada penelitian ini dilakukan perlakuan untuk memanipulasi objek penelitian disertai adanya kontrol (Nazir, 2003:63). Eksperimen yang dilakukan berupa uji hayati cara statis (*static bioassay*) menurut standar APHA (1995).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap dapat didefinisikan sebagai rancangan dengan beberapa perlakuan yang disusun secara random untuk seluruh unit percobaan. Desain ini digunakan karena percobaan dilakukan di laboratorium dan kondisi lingkungan dapat dikontrol (Nazir, 2003:63). Penelitian terdiri dari dua tahap yaitu *range finding test* dan *devinitif test*, untuk masing-masing uji dilakukan tiga kali pengulangan pada waktu yang berbeda.

Menurut Gomez & Kwanchai. (1995) penentuan banyaknya pengulangan masing-masing konsentrasi berdasarkan perhitungan rumus:

$$(t)(r-1) \geq 21$$

Keterangan :

t = Treatment (Perlakuan)

r = Replication (Pengulangan)

21 = Faktor nilai derajat kebebasan umum

Berdasarkan rumus di atas jika jumlah perlakuan (t) = 6 maka jumlah pengulangan dapat diketahui sebagai berikut :

$$(t)(r-1) \geq 21$$

$$(6)(r-1) \geq 21$$

$$r-1 \geq 3,5$$

$$r \geq 4,5$$

$$r \approx 5$$

maka pada penelitian ini dilakukan 5 kali pengulangan pada tiap konsentrasi dalam botol vial.

Penentuan botol vial dilakukan secara RAL yang diperoleh menggunakan program Microsoft Excel dengan rancangan selengkapnya ditampilkan pada Gambar 3.1 sebagai berikut:

D2	A5	B2	F5	C3	F4
E5	A3	F1	D1	C5	C2
F2	C1	B3	A2	B4	E1
B1	C4	B5	D3	A1	D4
E4	E3	A4	E2	D5	F3

Gambar 3.1 Rancangan Blok Percobaan Desain Penelitian secara RAL

Keterangan *range finding test*:

A= Konsentrasi Limbah cair kertas 0% (kontrol)

B= Konsentrasi Limbah cair kertas 0,01%

C= Konsentrasi Limbah cair kertas 0,1%

D= Konsentrasi Limbah cair kertas 1%

E= Konsentrasi Limbah cair kertas 10%

F= Konsentrasi Limbah cair kertas 100%

1,2,3,4 dan 5 = Pengulangan

Keterangan *definitive test*:

A= Konsentrasi Limbah cair kertas 0% (kontrol)

B= Konsentrasi Limbah cair kertas 15%

C= Konsentrasi Limbah cair kertas 22%

D= Konsentrasi Limbah cair kertas 32%

E= Konsentrasi Limbah cair kertas 46%

F= Konsentrasi Limbah cair kertas 68%

1,2,3,4 dan 5 = Pengulangan

Penentuan posisi botol pengamatan dan pengambilan botol pengamatan dilakukan secara acak tanpa membedakan botol perlakuan perlakuan dan kontrol. Penempatan posisi botol pada uji hayati dapat dilihat pada Gambar 3.2 dibawah ini.



Gambar 3.2 Posisi Penempatan Botol Vial Pada Uji Hayati
Sumber: Dokumentasi Pribadi

Organisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah neonate *Daphnia magna* yang telah dikultur dan berumur kurang dari 24 jam dengan masing-masing vial berjumlah 10 ekor neonate *Daphnia magna*, sehingga dalam satu kali penelitian memerlukan 300 ekor neonate *Daphnia magna*. Selama penelitian, parameter fisik dan kimiawi yaitu pH dan suhu harus dikontrol agar tidak mengalami perubahan berarti dan memberikan pengaruh pada organisme uji.

Uji pendahuluan yang dilakukan pada penelitian ini ialah tahap *range finding test* untuk menentukan nilai konsentrasi yang akan digunakan dalam tahap selanjutnya. Setelah *range finding test* dilakukan pada waktu yang berbeda dan

didapatkan rentang konsentrasi, maka dilanjutkan dengan tahap *definitive tes* yaitu tahap uji hayati dengan mempersempit nilai konsentrasi dari rentang konsentrasi yang didapat dalam uji pendahuluan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian yang dilakukan ialah seluruh neonate *Daphnia magna* yang berumur kurang dari 24 jam hasil pengkulturan di Laboratorium Ekologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Sampel yang digunakan ialah neonate *Daphnia magna* yang berjumlah 10 ekor pada tiap perlakuan dan pengulangan.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan awal bulan Agustus 2012 di Laboratorium Ekologi Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri atas beberapa tahapan yaitu tahap persiapan, pra penelitian dan penelitian.

1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan diawali dengan pengumpulan, pendataan (alat dan bahan yang akan digunakan yang terlampir dalam tabel alat dan bahan yang digunakan) dan pembersihan alat yang akan digunakan selama pra penelitian dan penelitian.

2. Tahap Pra Penelitian

Pra penelitian ini terdiri atas tiga tahap yaitu survei dan studi lapangan lokasi pengambilan sampel limbah yaitu di kawasan industri kertas Cikarang, Bekasi. Kultur *Daphnia magna* dan aklimatisasi hewan uji (*Daphnia magna*) pada medium *freshwater*.

a. Survei lokasi pengambilan sampel limbah kertas

Survei lokasi dilakukan sebelum pengambilan sampel limbah industri kertas di Cikarang, Kabupaten Bekasi. Kegiatan ini meliputi menyelesaikan berbagai persyaratan administrasi perizinan dari instansi lokasi pengambilan sampel dan menentukan lokasi pengambilan sampel limbah cair kertas.

b. Kultur *Daphnia magna*

Pada tahap kultur *Daphnia magna* disiapkan alat dan bahan berupa akuarium, air sumur sebagai medium kultur bagi *Daphnia magna* dan fermipan sebagai sumber makanannya (Sutarman, 2003:26). *Daphnia magna* diperoleh dari kultur yang ada di Puslitbang Sumber Daya Air dan dikultur kembali di Laboratorium Ekologi FPMIPA UPI sampai jumlahnya memenuhi untuk uji toksisitas.

Sebelum *Daphnia magna* dikultur, medium diaerasi terlebih dahulu selama kurang lebih 24 jam. Setelah pengulturan kemudian dipilih *Daphnia magna* dewasa yang siap bereproduksi. Pemilihan spesies ini berdasarkan morfologi dari *Daphnia magna* yang memiliki telur di bagian posterior dari tubuhnya. Kultur *Daphnia magna* dilakukan selama 3 minggu. Subkultur dilakukan dengan cara pemindahan induk *Daphnia magna* yang akan bereproduksi ke dalam *beaker glass*. Setelah subkultur dilakukan maka akan didapatkan neonate yang berumur kurang dari 24 jam. Sub kultur ini dilakukan dengan menggunakan banyak *beaker glass* hingga diperoleh *Daphnia magna* yang berumur kurang dari 24 jam yang cukup untuk digunakan dalam uji toksisitas. Kultur *Daphnia magna* di Puslitbang Sumber Daya Air (SDA) dan kultur *Daphnia magna* Laboratorium Ekologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI dapat dilihat pada Gambar 3.3 dan Gambar 3.4 dibawah ini.



Gambar 3.3 Kultur *Daphnia magna* di Puslitbang Sumber Daya Air (SDA)
Sumber: Dokumentasi Pribadi

c. Aklimatisasi *Daphnia magna* dalam medium *freshwater*

Bahan yang diperlukan dalam proses aklimatisasi dalam penelitian ini adalah larutan *freshwater* dengan konduktivitas 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Nilai konduktivitas 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ berdasarkan pra penelitian penentuan jenis medium kultur oleh Sutarman. (2003:27) menunjukkan bahwa *Daphnia magna* lebih cocok berada pada nilai konduktivitas 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Bahan yang digunakan untuk membuat 1 L medium *freshwater* (medium APHA, 2005) antara lain:

- 1) 0,096 g NaHCO_3
- 2) 0,06 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 3) 0,06 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 4) 0,004 g KCl .

Keempat bahan tersebut dilarutkan dalam 1 Liter *aquades* untuk mendapatkan 1 Liter medium *freshwater*. Medium *freshwater* digunakan untuk proses aklimatisasi

Daphnia magna selama kurang lebih 2 jam yang dilakukan sebelum pelaksanaan uji toksisitas. Proses aklimatisasi *Daphnia magna* dalam medium *freshwater* dapat dilihat pada Gambar 3.5 dibawah ini.



Gambar 3.4 Aklimatisasi *Daphnia magna* dalam Medium *Freshwater*
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3. Penelitian

Tahap penelitian meliputi pengambilan sampel limbah, analisis kimiawi limbah cair kertas, pengukuran faktor fisik-kimiawi larutan uji dan uji toksisitas akut *Daphnia magna*.

a. Pengambilan sampel limbah cair kertas

Proses pengambilan sampel limbah cair kertas dilakukan pada tanggal 29 Juni 2012 dengan cara mencuplik limbah secara langsung dari pipa pembuangan sebelum masuk ke sungai. Pengambilan sampel limbah pada saluran pembuangan industri kertas dapat dilihat pada Gambar 3.6 dibawah ini.



Gambar 3.5 Lokasi Pengambilan Sampel Limbah pada Saluran Pembuangan Limbah Cair Kertas
Sumber: Dokumentasi Pribadi

Limbah dimasukkan ke dalam jerigen polyetilen 2 L, ditutup rapat lalu dimasukkan ke dalam *cool box* (Hadi, 2005). Sampel limbah dimasukkan ke dalam kotak penyimpanan yang bersih dan tidak terkontaminasi zat-zat yang lain. Apabila sampel diperiksa lebih dari 36 jam maka sampel limbah harus dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Sembiring, S., Bambang, S dan Agus, H., 1992). Sampel limbah cair kertas dapat dilihat pada Gambar 3.7 dibawah ini.



Gambar 3.6 Sampel Limbah Cair Kertas
Sumber: Dokumentasi Pribadi

Sampel limbah dibawa ke laboratorium untuk disimpan dan dilakukan uji toksisitas dalam waktu kurang dari atau sama dengan satu bulan sejak pengambilan sampel (Hadi, 2005). Sampel limbah cair kertas yang digunakan merupakan limbah cair kertas yang berasal dari saluran pembuangan yang mengalir menuju sungai Cikarang dari salah satu industri kertas. Pengambilan sampel limbah ini dilakukan atas dasar kurang baiknya Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) di kawasan industri kertas karena air limbah kertas tersebut telah mencemari sungai Cikarang. Atas dasar untuk mengetahui kandungan yang ada dalam limbah cair kertas tersebut, sehingga sampel limbah diambil dari saluran pembuangan limbah secara langsung.

b. Analisis faktor fisik dan kimiawi limbah cair kertas

Setelah pengambilan sampel limbah cair kertas yang akan digunakan dalam uji hayati (*bioassays*), dilakukan juga pengambilan sampel limbah pada lokasi dan hari yang sama untuk dilakukan analisis secara fisik-kimiawi. Analisis kimia yang dilakukan yaitu analisis kadar BOD, COD, TSS, dan kandungan Klorida yang dilakukan di Balai Pengembangan Laboratorium Kesehatan dan pengukuran pH, dan konduktivitas dilakukan di Laboratorium Ekologi Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UPI. Prinsip kerja penentuan dari faktor kimiawi tersebut sebagai berikut:

1) Kadar BOD diukur menggunakan Metode Elektrometri (Oksigen Metri)

Biochemical Oxygen Demand (BOD) adalah ukuran kandungan bahan organik dalam limbah cair. BOD ditentukan dengan mengukur jumlah oksigen yang diserap oleh sampel limbah atau jumlah oksigen yang dibutuhkan oleh mikroorganisme di dalam air untuk mendegradasi atau mengoksidasi limbah

organik di dalam air. Prinsip penentuan nilai BOD ini didasarkan kepada angka BOD yang ditetapkan dengan menghitung selisih antara oksigen terlarut awal dengan oksigen terlarut setelah air sampel disimpan selama 5 hari pada suhu 20°C. Oksigen terlarut awal diibaratkan kadar oksigen maksimum yang dapat larut dalam air. Setelah disimpan selama 5 hari, diperkirakan bakteri telah berbiak dan menggunakan oksigen terlarut untuk oksidasi. Sisa oksigen terlarut yang ada diukur kembali, akhirnya konsumsi oksigen dapat diketahui dengan mengurangi kadar oksigen awal dengan oksigen akhir setelah 5 hari (SNI 6989.72:2009).

2) Kadar COD diukur menggunakan Metode Titrimetri

Chemical Oxygen Demand (COD) adalah jumlah oksigen yang diperlukan agar limbah organik yang ada di dalam air dapat teroksidasi melalui reaksi kimia. Limbah organik akan dioksidasi oleh Kalium bichromat ($K_2Cr_2O_7$) sebagai sumber oksigen menjadi gas CO_2 , H_2O dan sejumlah ion krom. Penentuan kadar COD pada limbah cair dilakukan dengan metode titrimetri menggunakan campuran H_2SO_4 dengan $K_2Cr_2O_7$ dan zat organik yang direfluks selama 2 jam. Sisa Kalium bichromat yang tidak tereduksi, dititrasi dengan larutan Ferro Ammonium Sulfat (FAS). Warna larutan air lingkungan yang mengandung bahan buangan organik sebelum reaksi oksidasi adalah kuning. Setelah reaksi oksidasi selesai maka akan berubah menjadi hijau. Jumlah oksigen yang diperlukan untuk reaksi oksidasi terhadap bahan buangan organik sama dengan jumlah Kalium bichromat yang dipakai pada reaksi oksidasi. Semakin banyak oksigen yang diperlukan berarti limbah semakin banyak tercemar oleh bahan buangan organik (SNI 6989.73:2009).

3) Kadar TSS diukur menggunakan Metode Gravimetri

Total Suspended Solids (TSS) merupakan bahan padat organik dan anorganik yang tersuspensi di dalam air. Metode ini digunakan untuk menentukan residu tersuspensi yang terdapat dalam sampel limbah secara gravimetri. Cara uji dan prinsip yaitu sampel yang telah homogen disaring dengan kertas saring yang telah ditimbang. Residu yang tertahan pada saringan dikeringkan sampai mencapai berat konstan pada suhu 103°C sampai dengan 105°C. Kenaikan berat saringan mewakili TSS. Jika padatan tersuspensi menghambat saringan dan memperlama penyaringan, diameter pori-pori saringan perlu diperbesar. Penentuan TSS, dihitung perbedaan antara padatan terlarut total dan padatan total (SNI 06-6989.3-2004).

4) Sisa Klor menggunakan metode Iodometri

Untuk mengetahui kadar klorin bebas dalam limbah cair kertas untuk setiap unsur klor aktif seperti klor tersedia bebas dan klor tersedia terikat memiliki analisa-analisa khusus. Namun, untuk analisa di laboratorium biasanya hanya klor aktif (residu) yang ditentukan melalui suatu analisa. Klor aktif dapat dianalisa melalui titrasi iodometri ataupun melalui metode kolorimetri dengan menggunakan DPD (Diethyl-p-fenilendiamin) (SNI 06-4824-1998).

5) pH diukur menggunakan pH Meter

pH larutan merupakan minus logaritma konsentrasi ion hidrogen yang ditetapkan dengan metode pengukuran secara potensiometri dengan menggunakan pH meter. Larutan penyangga (buffer) pH merupakan larutan yang dibuat dengan melarutkan garam dari asam lemah-basa kuat atau basa lemah-asam kuat sehingga

menghasilkan nilai pH tertentu dan stabil. Prinsip cara uji derajat keasaman (pH) dengan menggunakan alat pH meter adalah sebuah Metode pengukuran pH berdasarkan pengukuran aktifitas ion hidrogen secara potensiometri/elektrometri dengan menggunakan pH meter (SNI 06-2413-1991)

6) Konduktivitas diukur menggunakan Konduktimeter

Nilai konduktivitas merupakan ukuran terhadap konsentrasi total elektrolit di dalam air. Kandungan elektrolit yang pada prinsipnya merupakan garam-garam yang terlarut dalam air, berkaitan dengan kemampuan air dalam menghantarkan arus listrik. Semakin banyak garam-garam yang terlarut, semakin baik daya hantar listrik tersebut. Konduktimeter adalah metode analisis kimia berdasarkan daya hantar listrik berdasarkan larutan. Prinsip kerja dari alat ini berkaitan dengan daya hantar listrik dari suatu larutan yang berhubungan dengan jenis dan konsentrasi ion di dalam larutan. Bagian-bagiannya adalah sumber listrik yang didasarkan pada arus AC. Tahanan jenis yang digunakan untuk pengukuran daya hantar. Sel terdiri dari sepasang elektroda berupa logam yang dilapisi dengan logam untuk menahan ektivitas permukaan elektroda. (Zemanskey, 1962)

c. Uji toksisitas akut *Daphnia magna*

Optimasi kontrol perlu dilakukan sebelum pelaksanaan uji toksisitas akut. Optimasi kontrol terdiri atas perlakuan dengan 5 botol vial yang masing-masing berisi 10 ekor *Daphnia magna*. Hasil pengamatan optimasi kontrol digunakan untuk menentukan lama pengamatan uji toksisitas. Setelah optimasi kontrol dilakukan, maka dilanjutkan dengan uji pendahuluan (*Range Finding Test*) untuk menentukan konsentrasi limbah tertinggi yang menyebabkan kematian total

Daphnia magna dan konsentrasi terendah yang tidak menyebabkan kematian total *Daphnia magna* selama 24 jam. Uji toksisitas ini dilakukan dengan menggunakan botol vial berukuran 10 ml. Setiap botol vial berisi limbah cair kertas dengan konsentrasi 0,01%; 0,1%; 1%; 10%; 100% dan kontrol (0 %) dalam medium *freshwater* (Sembiring, S., Bambang, S dan Agus, H., 1992). Pengenceran limbah menggunakan rumus $M_1.V_1=M_2.V_2$. Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak lima kali. Untuk setiap botol vial berisikan sampel limbah sebanyak 10 ml dan 10 ekor *Daphnia magna*.

Pengukuran parameter fisik-kimiawi (suhu dan pH) diukur sebagai penunjang uji toksisitas. Pengukuran dilakukan pada awal dan akhir perlakuan dan nantinya akan diambil nilai rata-ratanya (*mean*). Jumlah *Daphnia magna* yang mati dan yang masih hidup dicatat dan uji ini dilakukan selama 2x24 jam (APHA, 2005:8-104).

Uji selanjutnya adalah *definitive test* sebagai uji lanjutan dengan prosedur yang hampir sama dengan *range finding test*. Pada *definitive test* digunakan konsentrasi pengenceran yang lebih dipersempit (berada dalam rentang konsentrasi kritis). Apabila rentang konsentrasi kritis terletak antara 10% dengan 100% maka konsentrasi yang digunakan adalah 0%, 15%, 22%, 32%, 46% dan 68%. Apabila rentang konsentrasi kritis terletak antara 1% dan 10%, maka konsentrasi yang digunakan adalah 0%, 1,5%, 2,2%, 3,2%, 4,6% dan 6,8% (EPS, 1990). Konsentrasi *definitive test* pada penelitian ini mengambil konsentrasi yaitu 0%, 15%, 22%, 32%, 46% dan 68%. Uji lanjutan ini bertujuan untuk mendapatkan nilai LC50 yang sesungguhnya. Penentuan konsentrasi uji hayati

berdasarkan seri logaritma dapat dilihat pada Tabel 3.1 dibawah ini.

Tabel 3.1 Penentuan Konsentrasi Uji Hayati *Definitive Test* Berdasarkan Seri Logaritma

Jumlah Konsentrasi diantara 100 dan 10 atau 10 dan 1 (tiap ulangan)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	25	32	37	42
1.0	4.6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	6.3	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.0	2.7	4.2
					1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

Sumber: EPS, 1990

d. Pengukuran faktor fisik dan kimiawi uji hayati

Pada saat uji hayati, faktor fisik-kimiawi larutan uji diukur kembali. Faktor fisik-kimiawi yang diukur yaitu suhu dengan menggunakan termometer dan pH dengan pH meter.

4. Analisis Data

Analisis data dilakukan setelah pengumpulan data hasil *Definitive Test* I, II, dan III pada waktu 24 jam dan 48 jam. Nilai LC50 diperoleh menggunakan analisis Probit dengan program komputer yaitu software Biostat 2009 dengan derajat kesalahan 5% ($\alpha=0,05$) (EPA, 2008:1). Hasil analisis data diperoleh nilai LC50 24 jam dan 48 jam yang mengindikasikan nilai konsentrasi limbah cair kertas yang mengakibatkan kematian 50% dari organisme uji selama 24 jam dan 48 jam.