

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen, karena pada penelitian ini dilakukan perlakuan untuk memanipulasi objek penelitian disertai dengan adanya kontrol (Nazir, 2003:63). Eksperimen yang dilakukan berupa uji hayati cara statis (*static bioassay*) menurut standar APHA (2005).

3.2. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). RAL 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). 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 (Kwanchai *et al*, 1995).

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

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

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

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

$$r \geq 4,5$$

$$r \approx 5$$

Pengacakan dan tata letak percobaan RAL (Gambar 3.1) diperoleh menggunakan program komputer Microsoft Excel dengan rancangan sebagai berikut :

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

Gambar 3.1. Rancangan Percobaan RAL

Keterangan

A=Konsentrasi larutan 0 ppm (kontrol) 1,2,3,4,5 = Pengulangan

B = Konsentrasi larutan 0,01 ppm

C = Konsentrasi larutan 0,1 ppm

D = Konsentrasi larutan 1 ppm

E = Konsentrasi larutan 10 ppm

F = Konsentrasi larutan 100 ppm

Pada penelitian ini digunakan deret logaritma yang sesuai untuk uji toksisitas untuk menentukan konsentrasi pengenceran (APHA, 2005). Penentuan posisi botol pengamatan dan pengambilan botol pengamatan dilakukan secara acak tanpa membedakan kontrol dan perlakuan

Organisme yang digunakan adalah neonate *Daphnia magna* hasil kultur yang berumur kurang dari 24 jam dengan jumlah individu masing-masing 10 ekor, sehingga satu *block design* memerlukan 300 ekor *Daphnia magna*. Hasil dari penelitian ini berupa nilai LC_{50} yaitu suatu nilai konsentrasi yang mengakibatkan kematian sebanyak 50% dari jumlah organisme uji. Selama penelitian dilakukan, parameter fisik dan kimiawi yaitu konduktivitas diukur dan dikontrol agar tidak mengalami perubahan berarti dan memberikan pengaruh terhadap organisme uji.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian yang dilakukan yaitu seluruh neonate yang berumur kurang dari 24 jam hasil pengkulturan di Laboratorium Ekologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI, sedangkan untuk sampel yaitu neonate ≤ 24 jam. Posisi penempatan botol vial pada uji hayati *Daphnia magna* yang berjumlah sepuluh ekor yang digunakan pada setiap perlakuan dan pengulangan.

3.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan April 2012 di Laboratorium Ekologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang akan digunakan di dalam penelitian tertera dalam lampiran I

3.6. Prosedur Penelitian

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

3.6.1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan diawali dengan pengumpulan, pendataan dan pembersihan alat yang akan digunakan selama pra penelitian dan penelitian.

3.6.2. Pra Penelitian

Pra Penelitian ini terdiri dari atas tiga tahap yaitu pembuatan larutan stok Cr, kultur *Daphnia magna* dan aklimatisasi hewan uji (*Daphnia magna*) pada medium *freshwater*.

3.6.3. Pembuatan Larutan Stok Cr dan pengencerannya

Larutan Cr 100 ppm dibuat dari senyawa $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,357 gr, lalu dilarutkan pada medium *freshwater* 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ hingga 300 ml. setelah didapatkan konsentrasi 100 ppm, maka akan dilakukan pengenceran menjadi 10 ppm, 1 ppm, 0,1 ppm, dan 0,01 ppm masing masing sebanyak 300 ml. pengenceran dilakukan dengan menggunakan medium *freshwater* 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

3.6.4. 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 1 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.

3.6.5. 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:

0,096 g 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

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.

3.7. Penelitian

3.7.1. Toksisitas akut *Daphnia magna*

Optimasi kontrol perlu dilakukan sebelum pelaksanaan uji toksisitas akut. Optimasi kontrol terdiri atas perlakuan dengan 6 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 larutan kromium (Cr) 0,01 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan kontrol (0 %) dalam medium *freshwater*. Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak lima kali. Untuk setiap botol vial berisikan larutan kromium (Cr) sebanyak 10 ml dan 10 ekor *Daphnia magna*.

Pengukuran parameter fisik-kimiawi suhu, pH, dan konduktivitasnya 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 2 x 24 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 ppm dan 100 ppm maka konsentrasi yang digunakan adalah 0 ppm, 15 ppm, 22 ppm, 32 ppm, 46 ppm dan 68 ppm. Apabila rentang konsentrasi kritis terletak antara 1 ppm dan 10 ppm, maka konsentrasi yang digunakan adalah 0 ppm, 1,5 ppm, 2,2 ppm, 3,2 ppm, 4,6 ppm dan 6,8 ppm (EPS, 1990). Uji lanjutan ini bertujuan untuk mendapatkan nilai LC_{50} yang sesungguhnya.

3.7.2. Pengukuran faktor fisik dan kimiawi

Larutan 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 indikator universal.

3.8. Tahap Analisis Data

Analisis data dilakukan setelah pengumpulan data hasil *Definitive Test* dan nilai parameter fisik-kimiawi. Nilai LC_{50} diperoleh menggunakan analisis Probit dengan program komputer yaitu software Biostat 2009 dengan derajat kesalahan

5% ($\alpha=0,05$) (Hamilton, 1977 dalam EPA, 2008:1). Hasil analisis data diperoleh nilai LC_{50} 24 jam dan 48 jam yang mengindikasikan nilai konsentrasi Larutan Kromium (Cr) yang mengakibatkan kematian 50% dari organisme uji selama 24 jam dan 48 jam.



