

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen, karena pada penelitian ini diberikan perlakuan untuk memanipulasi objek penelitian disertai dengan adanya kontrol (Nazir, 2003). Eksperimen yang dilakukan berupa uji hayati cara statis (*static bioassay*) (APHA, 2005).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain ini digunakan karena percobaan dilakukan di laboratorium dan kondisi lingkungan dapat dikontrol (Nazir, 2003). Penelitian terdiri dari dua tahap yaitu *range finding test* dan *definitive test*. Untuk masing-masing uji diulang sebanyak tiga kali dalam waktu yang berbeda. Pada kedua tes, terdiri dari satu kontrol dan lima perlakuan konsentrasi limbah penyamakan kulit yang masing-masing terdiri atas lima kali pengulangan.

Menurut Gomez dan Gomez (1995) penentuan banyaknya jumlah pengulangan dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

t = *treatment* (perlakuan)

r = *replication* (pengulangan)

21 = faktor nilai derajat kebebasan

Berdasarkan rumus tersebut jika jumlah perlakuan (t) = 5 maka jumlah pengulangan dapat diketahui sebagai berikut:

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

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

$$6r - 6 \geq 21$$

$$6r \geq 27$$

$$r \geq 4,5$$

$$r \approx 5$$

maka, pada penelitian ini dilakukan 5 kali pengulangan.

Penentuan posisi botol vial dilakukan secara acak. Rancangan selengkapnya ditampilkan pada Gambar 3.1 dan Gambar 3.2.

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

Gambar 3.1 Rancangan Blok Desain Penelitian

Keterangan:

- A = konsentrasi limbah penyamakan kulit 0% (kontrol)
- B = konsentrasi limbah penyamakan kulit 0,01%
- C = konsentrasi limbah penyamakan kulit 0,1%
- D = konsentrasi limbah penyamakan kulit 1%
- E = konsentrasi limbah penyamakan kulit 10%
- F = konsentrasi limbah penyamakan kulit 100%
- 1, 2, 3, 4, dan 5 = pengulangan



Gambar 3.2 Posisi Penempatan Vial pada Uji Hayati
Sumber: Dokumentasi Pribadi

Setelah dilakukan *range finding test* sebanyak tiga kali dalam waktu yang berbeda, maka selanjutnya dilakukan *definitive test* yaitu dengan cara mempersempit konsentrasi yang telah didapat dari *range finding test* dan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dalam waktu yang berbeda.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian yang dilakukan yaitu keseluruhan dari *neonate* yang berumur kurang dari 24 jam hasil pengulturan di Laboratorium Ekologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Sampel yang digunakan adalah *neonate Moina sp.*, pada masing-masing perlakuan berjumlah 10 individu *neonate*.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai dengan bulan Mei 2011 di Laboratorium Ekologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Prosedur Penelitian

Prosedur kerja pada penelitian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu tahap persiapan, pra-penelitian dan penelitian. Rincian prosedur kerja sebagai berikut:

1. Tahap Persiapan

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan tahap persiapan. Pada tahap ini melakukan pendataan, pengumpulan dan pembersihan alat-alat yang digunakan selama pra-penelitian dan penelitian.

2. Pra-Penelitian

Pra-penelitian terdiri dari survey lokasi pengambilan sampel limbah, kultur *Moina* sp. dan pra-penelitian uji toksisitas untuk mengetahui lamanya waktu pengamatan mortalitas *Moina* sp. saat pelaksanaan penelitian.

Prosedur pra-penelitian adalah sebagai berikut:

a. Survey dan Studi Lapangan

Survey dan studi lapangan dimaksudkan untuk menentukan lokasi pengambilan sampel limbah. Selain itu untuk mengetahui kondisi lapangan mengenai keberadaan industri penyamakan kulit di daerah Sukaregang, Kabupaten Garut. Survey juga dilakukan ke tempat pembenihan ikan yang

berada di Desa Cisaranten, Kabupaten Bandung untuk persediaan kultur *Moina* sp.

Sampel limbah adalah limbah penyamakan kulit, yang berasal dari pembuangan salah satu industri kulit yang mengalir menuju Sungai Ciwalen. Pengambilan sampel limbah ini dilakukan atas dasar tidak berfungsinya Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) di kawasan industri penyamakan kulit Sukaregang. Oleh karena itu, sampel limbah diambil dari pembuangan air limbah tanpa melalui IPAL. Sampel limbah diambil sebanyak 4 liter, dilakukan dengan cara mencuplik langsung kemudian sampel limbah dimasukkan ke dalam jerigen plastik polietilen, ditutup rapat lalu dimasukkan ke dalam *cool box* (Indira dan Mycin, 2010). Apabila sampel diperiksa lebih dari 36 jam maka sampel limbah harus dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Sembiring *et al.*, 1992). Lokasi pengambilan sampel limbah penyamakan kulit dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3 Lokasi Pengambilan Sampel Limbah di Salah Satu Pembuangan

Industri Penyamakan Kulit Sukaregang, Garut.
Sumber: Dokumentasi Pribadi



Gambar 3.4 Penyimpanan Sampel Limbah Dalam Lemari Pendingin
Sumber: Dokumentasi Pribadi

b. Pemeliharaan dan Kultur *Moina* sp.

Pemeliharaan *Moina* sp. dilakukan selama penelitian berlangsung untuk persediaan (*stock*) hewan uji yang akan digunakan pada penelitian. Pupuk makanan *Moina* sp. selama pemeliharaan adalah bungkil kelapa sawit karena mengandung nitrogen dan fosfat yang dapat merangsang pertumbuhan plankton dan bakteri, yang merupakan makanan *Moina* sp. Kandungan nutrisi pada bungkil kelapa sawit antara lain protein 18,27%, air 4,92%, lemak 9,51%, serat kasar 25,19%, abu 3,94% dan karbohidrat 38,17% (Abidin, 2006).

Suhu selama pemeliharaan berkisar antara 24-25°C dan pH 7. Kemudian *Moina* sp. dikultur pada medium *freshwater* dengan komposisi *freshwater* 0,096 g NaHCO₃; 0,06 g CaSO₄.2H₂O; 0,06 g MgSO₄.7H₂O; 0,004 g KCl, dan 1 L akuades (EPA, 2008). Kultur dilakukan untuk mendapatkan *neonate* *Moina* sp. berumur kurang dari 24 jam yang akan digunakan pada penelitian. Sebelum digunakan dalam penelitian, *neonate* diaklimatisasi pada medium *freshwater* selama 2 jam.



Gambar 3.5 Kultur *Moina* sp. untuk Mendapatkan *Neonate*
Sumber: Dokumentasi Pribadi

c. Pra-Penelitian Uji Toksisitas

Pra-penelitian uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui daya hidup *Moina* sp. tanpa diberi pakan selama tiga hari, karena pada pengujian toksisitas nantinya *Moina* sp. sebagai hewan uji tidak diberi pakan, hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa yang menyebabkan kematian pada hewan

uji adalah zat pencemar yang terdapat pada sampel limbah. Larutan uji yang digunakan pada pra-penelitian adalah *freshwater* sebagai kontrol. Pra-penelitian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dalam minggu yang berbeda. Setiap botol vial (10 ml) berisi 10 *neonate Moina* sp. Pengamatan mortalitas dilakukan pada jam ke-24, 48 dan 72 jam. Dari ketiga jam pengamatan tersebut dilihat persentase mortalitas *Moina* sp. yang kematiannya kurang dari 20%, hal ini untuk menentukan lamanya waktu pengamatan pada saat uji toksisitas. Lamanya waktu pengamatan untuk uji toksisitas akut tidak menyebabkan hewan uji mengalami kematian lebih dari 20% (APHA, 2005).

3. Penelitian

Pada pelaksanaan penelitian terdiri dari tiga bagian, yaitu analisis fisik-kimiawi limbah penyamakan kulit, pengukuran faktor fisik-kimiawi larutan uji hayati dan pelaksanaan uji toksisitas. Adapun penjelasannya sebagai berikut:

a. Analisis Fisik-Kimiawi Limbah Penyamakan Kulit

Faktor fisik-kimiawi yang dianalisis yaitu total padatan tersuspensi atau *Total Suspended Solid* (TSS), kebutuhan biologis oksigen atau *Biochemical Oxygen Demand* (BOD), kebutuhan oksigen kimiawi atau *Chemical Oxygen Demand* (COD), sulfida dan krom total. Analisis kimiawi limbah penyamakan kulit dikerjakan di Balai Laboratorium Kesehatan, Bandung. Prinsip kerja penentuan faktor kimiawi tersebut adalah sebagai berikut:

1) *Total Suspended Solid (TSS)*

Total Suspended Solid (TSS) adalah jumlah berat dalam mg/liter kering lumpur yang ada dalam limbah setelah mengalami penyaringan dengan membran berukuran 0,45 mikron. Pengukuran TSS menggunakan metode gravimetri dengan menentukan zat terlarut dalam air yang tertahan membran saring yang berukuran 0,45 mikron. Kemudian dikeringkan dalam oven pada temperatur 103-105°C, hingga diperoleh berat tetap. Partikel yang sama besar yaitu partikel yang mengapung dan zat-zat yang menggumpal yang tidak tercampur dalam air, terlebih dahulu dipisahkan sebelum pengujian (APHA, 1995).

2) *Biochemical Oxygen Demand (BOD)*

Kebutuhan oksigen biologis atau *Biochemical Oxygen Demand (BOD)* adalah jumlah oksigen yang dibutuhkan oleh mikroorganisme di dalam air lingkungan untuk mendegradasi atau mengoksidasi limbah organik yang terdapat didalam air. Angka BOD ditetapkan dengan menghitung selisih antara oksigen terlarut awal dengan oksigen terlarut setelah air cuplikan (sampel) disimpan selama 5 hari pada suhu 20°C. Oksigen terlarut awal diibaratkan kadar oksigen maksimal yang dapat larut di 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) (APHA, 1995).

3) *Chemical Oxygen Demand (COD)*

Kebutuhan oksigen kimiawi atau *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 bikromat ($K_2Cr_2O_7$) sebagai sumber oksigen menjadi gas CO_2 dan H_2O serta sejumlah ion krom. Setelah pemanasan maka sisa dikromat diukur. Pengukuran ini dengan jalan titrasi, oksigen yang ekuivalen dengan dikromat inilah yang menyatakan nilai COD. Nilai COD merupakan ukuran bagi tingkat pencemaran oleh bahan organik (APHA, 1995).

4) Sulfida

Sulfida merupakan gas alam belerang. Pada air limbah sulfida merupakan hasil pembusukan zat organik berupa hidrogen sulfida atau H_2S . Hidrogen sulfida yang diproduksi oleh mikroorganisme pembusuk dari zat-zat organik bersifat racun terhadap ganggang dan mikroorganisme lainnya, tetapi sebaliknya hidrogen sulfida dapat digunakan oleh bakteri fotosintetik sebagai donor elektron atau hidrogen untuk mereduksi karbondioksida (CO_2). Hasil pembusukan zat-zat organik tersebut menimbulkan bau busuk pada lingkungan sekitarnya (Christian, 1994). Pengukuran sulfida menggunakan metode titrasi iodometri. Titrasi iodometri yaitu titrasi tidak langsung, oksidator yang dianalisis kemudian direaksikan dengan ion iodida berlebih dalam keadaan yang sesuai, selanjutnya iodium dibebaskan secara kuantitatif

dan dititrasi dengan larutan standar atau asam. Titrasi iodometri ini termasuk golongan titrasi redoks mengacu pada transfer elektron (APHA, 1995).

5) Krom total

Krom total merupakan logam yang terkandung dalam limbah cair industri penyamakan kulit. Kadar krom total diukur menggunakan alat spektrofotometer serapan atom atau AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). Metode AAS berprinsip pada absorpsi cahaya oleh atom. Atom-atom menyerap cahaya tersebut pada panjang gelombang tertentu, tergantung pada sifat unsurnya. AAS dapat digunakan untuk mengukur 61 jenis logam. Atom-atom dari sampel akan menyerap sebagian sinar yang dipancarkan oleh sumber cahaya. Penyerapan energi oleh atom terjadi pada panjang gelombang tertentu sesuai dengan energi yang dibutuhkan oleh atom tersebut. Nilai absorbansi yang diukur dapat diartikan sebagai kadar logam yang diukur (APHA, 1995).

b. Pengukuran Faktor Fisik-Kimiawi Larutan Uji Hayati

Faktor fisik-kimiawi yang diukur dari larutan uji hayati adalah suhu dan pH medium. Suhu diukur menggunakan termometer dan pH diukur menggunakan pH indikator universal. Pengukuran parameter fisik-kimiawi larutan uji diukur pada awal dan akhir perlakuan, kemudian diambil nilai rata-ratanya (*mean*) (APHA-AWWA-WPCP 1985, dalam Tong *et al.*, 1996).

c. Uji Toksisitas Akut *Moina* sp.

Uji toksisitas terdiri dari dua uji, yaitu uji pendahuluan (*range finding test*) dan uji penentuan LC_{50} (*definitive test*). Uji ini diawali dengan uji pendahuluan (*range finding test*) untuk menentukan rentang konsentrasi pada *definitive test*. Uji toksisitas ini dilakukan dengan menggunakan botol vial (10 ml), masing-masing vial berisi 10 *neonate Moina* sp. Pada *range finding test* setiap botol vial berisi limbah penyamakan kulit dengan konsentrasi 0; 0,01; 0,1; 1; 10; dan 100% (Sembiring, *et al.*, 1992). Pengenceran limbah menggunakan rumus $M_1.V_1=M_2.V_2$. Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak lima kali. Jumlah *neonate Moina* sp. yang masih hidup dicatat dan uji ini dilakukan selama 2×24 jam (APHA, 2005).

Uji selanjutnya adalah *definitive test* sebagai uji lanjutan dari *range finding test*, dengan konsentrasi pengenceran yang dipersempit. Uji lanjutan ini bertujuan untuk menentukan nilai LC_{50} yang sesungguhnya. Apabila rentang konsentrasi kritis terletak antara 10% dan 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* yang digunakan pada penelitian ini yaitu 0; 15; 22; 32; 46; dan 68%. Penentuan konsentrasi uji hayati berdasarkan seri logaritma dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Penentuan Konsentrasi Uji Hayati Berdasarkan Seri Logaritma

Kolom (Jumlah knsentrasi diantara 100 dan 10 atau diantara 10 dan 1)						
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
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	2.4
					1.4	1.8
					1.0	1.3
						1.0

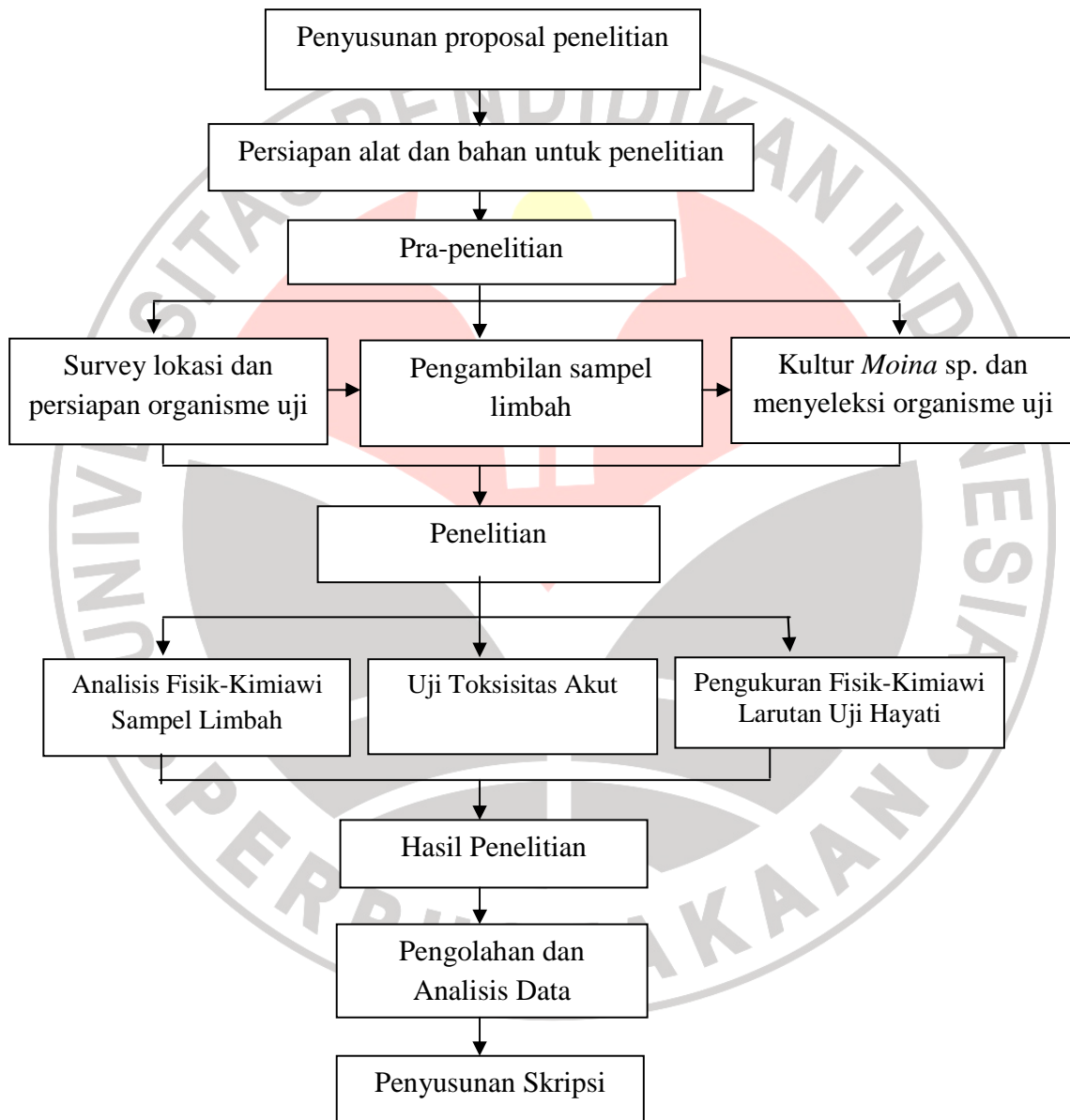
Sumber: EPS, 1990

F. Analisis Data

Untuk mendapatkan nilai LC_{50} dilakukan perhitungan dengan analisis probit menggunakan software BioStat 2009, $\alpha = 0,05$ (Hammilton, 1977 dalam EPA, 2008:1). LC_{50} ini merupakan konsentrasi yang menyebabkan kematian sebesar 50% dari populasi hewan uji.

G. Alur Penelitian

Langkah-langkah penelitian mulai dari awal sampai penyusunan laporan penelitian (skripsi) dapat dilihat pada Gambar 3.6.



Gambar 3.6 Alur Penelitian