

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental, yaitu berupa uji hayati statis (*static bioassay*), menurut standar American Public Health Association (APHA, 2005). Penelitian eksperimental dapat diartikan sebagai penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel yang lain dengan kontrol yang ketat (Sedarmayanti & Syarifudin, 2002). Penelitian ini terdapat manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol.

B. 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). Menurut Gomez & Kwanchai (1995), penentuan banyaknya pengulangan masing masing konsentrasi berdasarkan perhitungan berikut :

$$(t)(r-1) > 21$$

Keterangan :

t = konsentrasi

r = pengulangan

21 = faktor nilai derajat kebebasan umum

Berdasarkan rumus di atas jika jumlah perlakuan enam persampel (t) = 6 jumlah pengulangan dapat dilakukan sebagai berikut :

$$(6)(r-1) > 21$$

$$(6)(r-1) > 21$$

$$r-1 > 3,5$$

$$r > 4,5$$

$$r = 5$$

Pengacakan data dan tata letak percobaan RAL diperoleh sebagai berikut :

B4	C1	B2	F5 ₂₄	C3	F4
E5	A3	F1	D1	C5	C2
B1	A5	B3	A2	D2	E1
A4	C4	D5	D3	A1	D4
F2	E5	B2	E2	B5	E2

Keterangan :

A = Konsentrasi larutan 0 ppm (control)

B = Konsentrasi larutan 0,01 ppm

C = Konsentrasi 0,1 ppm

D = Konsentrasi 1 ppm

E = Konsentrasi 10 ppm

F = Konsentrasi 100 ppm

1,2,3,4,5 = Pengulangan

C. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian adalah seluruh *neonate* yang berumur kurang dari 24 jam hasil pengkulturan di Laboratorium Riset Lingkungan Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI, sedangkan untuk sampel adalah *neonate Daphnia magna*. Penempatan botol vial dilakukan secara acak dan setiap botol vial yang digunakan uji hayati hanya dimasukan 10 ekor *neonate Daphnia magna* yang digunakan pada setiap perlakuan dan pengulangan.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Januari 2017 sampai dengan Maret 2017 yang dilaksanakan di Laboratorium Riset Lingkungan Biologi Fakultas Pendidikan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia Jalan Dr. Setiabudi No. 229 Bandung.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu tahap persiapan, dan tahap penelitian.

1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan diawali dengan pengumpulan, pendataan, dan pembersihan alat yang akan digunakan selama penelitian, survey pemilihan sampel, pembuatan *freshwater* serta kultur stok. Survey dilakukan di Pasar Gerlong Setiabudi dengan beberapa pertimbangan, serta pengujian secara kimia terhadap sampel minuman ringan kemasan gelas. Terakhir adalah pengujian secara kimia terhadap kandungan minuman ringan kemasan gelas.

a. Survey Sampel

Penentuan sample dilakukan dengan cara survey ke satu pasar yaitu, Pasar Geger Kalong pada Tanggal 16 November 2016. Dalam menentukan minuman ringan kemasan gelas yang dijadikan sebagai sampel untuk penelitian, kami memperhatikan hal-hal sebagai berikut:

1. Jumlah minuman paling banyak yang terdapat di ke 5 agen yang ada.
2. Tidak terdapat label halal pada minuman kemasan.
3. Tidak terdapat izin BPOM pada minuman kemasan.
4. Tidak terdapat tanggal kedaluwarsa pada minuman kemasan

Berdasarkan kriteria di atas nantinya dipilih 5 sampel minuman. Ke lima minuman kemasan tersebut dilakukan uji kimia sebelum digunakan sebagai sampel penelitian. Uji kimia tersebut untuk mengetahui kandungan apa saja dan kadar yang terdapat pada sampel minuman.

b. Analisis Kandungan Kimia terhadap Sampel Minuman Ringan Kemasan Gelas

Minuman ringan kemasan gelas yang dijadikan sebagai sampel penelitian sebelumnya dilakukan pengujian secara kimia untuk mengetahui kandungan dan kadarnya. Pengujian terhadap sampel berupa beberapa bahan tambahan pangan seperti kadar glukosa,

siklamat, pewarna dan natrium benzoat. Pengujian secara kimia terhadap sampel penelitian bertujuan untuk meyakinkan bahwa minuman ringan kemasan gelas yang dijadikan sampel penelitian memang mengandung bahan tambahan pangan (BTP) berupa pemanis dan pengawet. Pengujian BTP berupa pengawet yaitu benzoate menggunakan alat spektrofotometer dengan metode titrasi. Pengujian kimia dilakukan di Balai Laboratorium Pengembangan Kesehatan Provinsi Jawa Barat Jalan Sederhana No 3-5 Bandung.

c. Pembuatan *Freshwater*

Dalam penelitian uji toksisitas *freshwater* digunakan untuk control dan subkultur. Telah diketahui sebelumnya bahwa merupakan sumber sumber air yang baik untuk pertumbuhan *Daphnia magna* (APHA, 2005). Bahan yang digunakan dalam pembuatan 1L *freshwater* diantaranya adalah :

- 0,096 g/L NaHCO₃
- 0,06 g/1L CaCl₂·2H₂O
- 0,06g/L MgSO₄ ·7H₂O
- 0,004 g/L KCL

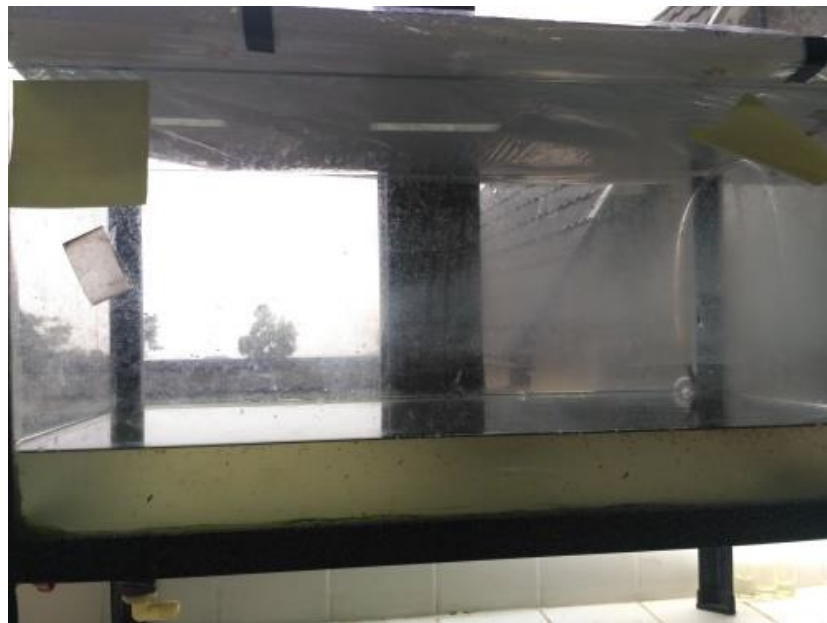
Selanjutnya, keempat bahan tersebut dilarutkan dengan menggunakan aquadest hingga 1L, kemudian diaerasi kurang lebih selama 1 jam.

d. Aklimatisasi dan pembuatan kultur stock *Daphnia magna*

Daphnia magna yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Keairan (PUSAIR) (Gambar 3.1), sehingga perlu adanya aklimatisasi terhadap suasana serta keadaan di dalam Laboratorium tempat pengujian. Pada tahap ini *Daphnia magna* diaklimatisasi dan di buat stock selama 3 minggu. Dalam aklimatisasi dan pembuatan kultur stok ini dibutuhkan alat berupa 4 aquarium ukuran 40 x 60 cm, 1 saringan dan baskom berukuran 20 X 40 cm. Air yang digunakan sebagai medium kultur adalah air sumur, karena ketersediannya yang banyak dan melimpah, serta permifan sebagai sumber makanannya.



Gambar 3.1 Kultur *Daphnia magna* di Pusat Penelitian Pengembangan Keairan (PUSAIR).
(Dokumentasi Pribadi,2017)



Gambar 3.2 Kultur *Daphnia magna* di Laboratorium Riset Lingkungan Biologi UPI.
(Dokumentasi Pribadi,2017)

2. Tahap Penelitian

- a. Pengamatan Rata-rata jumlah *neonate* per indukan *Daphnia* dengan perlakuan (medium air, dan pakan)

Sebanyak 15 beakerglass ukuran 250 ml diisi freh water, air sumur, dan air ledeng pada setiap perlakuannya, selanjutnya 10 ekor indukan *Daphnia magna* yang siap bereproduksi (berukuran besar dan gendut), dimana secara morfologis terlihat telur-telurnya pada daerah posterior (Gambar 3.3) dimasukan kedalam beakerglass. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kalipada setiap perlakuan. Berikutnya, dilakukan pengamatan pada hari selanjutnya pada waktu yang sama selama 3 hari berturut-turut untuk melihat jumlah *neonate* yang dihasilkan dengan menggunakan medium air yang berbeda (*freshwater*, ledeng, dan air sumur). Prosedur di atas dilakukan kembali dengan menggunakan perlakuan pakan yang berbeda yaitu permifan dan alga akan tetapi menggunakan medium air yang sama yaitu *freshwater*.



Gambar 3.3 *Gravid Female Daphnia magna*
(Dokumentasi pribadi, 2017)

- b. Pengamatan mortalitas *Daphnia* dengan *Daphnia* dengan perlakuan (medium air, dan pakan).

Dalam pengamatan mortalitas *Daphnia* yang digunakan adalah *neonate* yang berumur kurang dari 24 jam, *neonate* yang digunakan berasal dari hasil pengamatan yang dilakukan sebelumnya. 22 botol vial ukuran 10ml diisi 10ml *freshwater* yang telah dipersipkan

sebelumnya. Selanjutnya di masukan 10 ekor *neonate* ke dalam setiap botol vial. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali pada setiap perlakuan yang digunakan. Berikutnya dilakukan pengamatan keesokan harinya pada waktu yang sama selama 3 hari berturut-turut untuk melihat mortalitas *neonate* Daphnia dengan menggunakan medium air yang berbeda (*freshwater*, ledeng, dan air sumur). Prosedur di atas dilakukan kembali dengan menggunakan perlakuan pakan yang berbeda yaitu permifan dan alga akan tetapi menggunakan medium air yang sama yaitu *freshwater*.

c. Percobaan tanpa perlakuan

Percobaan ini dilakukan untuk melihat seberapa lama Daphnia dapat bertahan hidup dengan tanpa pemberian dan perlakuan apapun. Pertama indukan *Daphnia magna* di subkultur 1 hari sebelum percobaan dilakukan. Selanjutnyasiapkan masing masing 5 botol vial yang telah diisi *freshwater*. Kemudian keesokan harinya 10 *neonate* dari hasil subkultur sebelumnya dimasukan kedalam botol vial yang telah diisi *freshwater*. Pengamatan dilakukan dihari berikutnya pada jam yang sama selama tiga hari berturut-turut.

d. Uji *Range finding test*

Uji *Range finding test* dilakukan untuk menentukan konsentrasi sampel tertinggi yang bisa menyebabkan kematian total pada *Daphnia magna* dan konsentrasi terendah yang tidak menyebabkan kematian total *Daphnia magna* selama 24 jam dan 48 jam (APHA,2005). Pertama 10 botol vial berukuran 10ml di isi sampel minuman ringan kemasan gelas dengan konsentrasi 0,0; 0,1; 1; 100 dan kontrol 0% menggunakan medium *freshwater* (*Environment Protection Series EPS*, 1990). Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali, dimana dalam satu kali pengulangan uji, baik *Range finding test* maupun *Range Definitive test* terdapat 5 botol untuk setiap konsentersasi dengan jumlah larutan dan jumlah hewan yang sama. 10 ekor *neonate* Daphnia yang berumur kurang dari 24 jam dimasukan kedalam botol

vial yang telah diisi sampel. Pengukuran parameter fisik, kimiawi (suhu dan pH) di lakukan untuk menunjang uji toksisitas. Pengukuran dilakukan pada awal dan akhir perlakuan dan nantinya akan diambil nilai rata-ratanya. Jumlah *Daphnia magna* yang mati dan yang masih hidup di catat dan uji ini dilakuakn selama 2 x 24 jam (*Environment Protection Series EPS*, 1990).

e. Uji *Definitive test*

Prosedur uji *Definitive test* memiliki prosedur yang hampir sama dengan Uji *Range finding test*. Pada *Definitive test* digunakan konsentrasi pengenceran yang lebih dipersempit (berada dalam *range* konsentrasi kritis), apabila *range* konsentrasi kritis terletak antara 10% sampai dengan 100 % maka konsentrasi yang digunakan adalah 15; 22; 32; 46; dan 68% (*Environment Protection Series* 1990). Uji *Definitive test* ini bertujuan untuk mendapatkan nilai LC₅₀, pada konsentarsi berapa kematian *Daphnia magna* terjadi. Penentuan konsentrasi Uji hayati ini berdasarkan logaritma.

F. Analisis Data

Analisis data dilakukan setelah pengumpulan data hasil *Definitive test*. Nilai LC₅₀ diperoleh menggunakan analisis Probit dengan program komputer yaitu software IBM SPSS 23. Hasil analisis data diperoleh nilai LC₅₀ 24 jam dan 48 jam yang mengindikasikan nilai konsentrasi sampel minuman air kemasan yang mengakibatkan kematian 50% dari organisme uji selama 24 jam dan 48 jam.

G. Alur Penelitian

