

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental, yaitu penelitian yang menguji ada atau tidak pengaruh perlakuan terhadap objek penelitian disertai dengan adanya kontrol (Creswell, 2012). Penelitian ini merupakan uji toksisitas akut dengan metode statis dengan berdasarkan pada *Environmental Protection Series* (EPS, 1990).

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium sehingga kondisinya dapat dikontrol serta perlakuan yang disusun secara acak (Nazir, 2003). Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama adalah uji pendahuluan (*Range Finding Test*) dan tahap kedua adalah uji lanjutan (*Definitive Test*). Setiap pengujian menggunakan lima konsentrasi disertai kontrol. Dilakukan lima kali pengulangan untuk setiap konsentrasi serta dilakukan tiga set pengujian. Menurut Gomez dan Gomez (1995), jumlah pengulangan yang dilakukan pada setiap konsentrasi didapat dari hasil perhitungan rumus berikut:

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

Keterangan: $t = \text{treatment}$ (perlakuan)

$r = \text{replication}$ (pengulangan)

21= faktor nilai derajat kebebasan umum

Apabila terdapat enam perlakuan ($t=6$), jumlah pengulangan yang dilakukan berdasarkan perhitungan berikut ini:

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

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

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

$$r \geq 4,5$$

$$r \approx 5$$

Penyusunan letak botol vial dilakukan secara acak, yaitu sebagai berikut:

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

Gambar 3.1 Penyusunan vial secara RAL

Keterangan (Konsentrasi pada RFT):

A= Kontrol

B= Konsentrasi 0,01%

C= Konsentrasi 0,1%

D= Konsentrasi 1%

E= Konsentrasi 10%

F= Konsentrasi 100%

1, 2, 3, 4, 5= Pengulangan

Uji ini menggunakan *neonate D. magna* (berusia <24 jam). *Neonate* merupakan *D. magna* yang baru keluar dari tubuh induknya dan berusia kurang dari 24 jam. *Neonate* paling baik digunakan dalam uji toksisitas karena sangat sensitif (EPS, 1990). Setiap botol vial diisi 10 ekor *neonate* dengan larutan uji sebanyak 10 ml. Parameter fisik dan kimiawi berupa suhu dan pH dikontrol selama pengujian dilakukan. PH minuman yang digunakan netral dan suhu lingkungan $\pm 20^{\circ}\text{C}$.

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2018 sampai bulan April 2018. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI yang berlokasi di Jl. Dr. Setiabudhi, No.229 Kota Bandung.

3.4 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh *neonate D. magna* yang berusia kurang dari 24 jam. *Daphnia magna* yang digunakan merupakan hasil kultur di Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

Sampel pada penelitian ini, yaitu *neonate D. magna* dengan usia kurang dari 24 jam yang digunakan pada setiap perlakuan dan pengulangannya.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Berikut variabel dari penelitian ini.

- 1) Variabel Bebas: Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi uji pendahuluan dan uji lanjutan dari empat jenis minuman kemasan.
- 2) Variabel Terikat: Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah *neonate D. magna* yang mati saat 24 jam dan 48 jam.

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu tahap pra penelitian dan tahap penelitian.

3.6.1 Pra penelitian

Tahap pra penelitian terdiri dari survei minuman kemasan gelas, analisa kandungan sampel minuman kemasan gelas, aklimatisasi dan kultur *D. magna*, dan pembuatan *freshwater*.

1) Survei Minuman Kemasan Gelas

Survei minuman kemasan gelas dilakukan sebanyak tiga kali di agen minuman yang terdapat di Pasar Ujungberung yang terletak di Jl. A.H. Nasution Bandung. Minuman yang dipilih untuk penelitian merupakan minuman kemasan gelas yang bening dengan kriteria tidak terdapat tanggal kedaluwarsa pada kemasan, tidak terdaftar di Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM), tidak ada label Halal, dan jumlah di agen minuman banyak (Surtikanti, dkk. 2018).

2) Pemeriksaan Kadar Kandungan Sampel Minuman Kemasan Gelas

Pemeriksaan kadar kandungan bahan pada sampel minuman dilakukan untuk mengetahui kandungan dan kadar BTP yang terdapat pada sampel minuman gelas yang akan diuji. Kandungan kimia yang diuji pada sampel minuman adalah pemanis sintesis berupa siklamat, diuji menggunakan metode destruksi dan gravimetri. Bahan pengawet berupa benzoat, diuji menggunakan metode ekstraksi dan titrasi. Kadar gula diuji dengan metode destruksi dan titimetri, serta zat

pewarna yang diuji dengan menggunakan metode ekstraksi dan elusi. Pengujian bahan kimia tersebut diserahkan kepada Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat yang berlokasi di Jl. Sederhana no.5 Sukajadi, Kota Bandung. Data hasil analisa kimia ini berfungsi sebagai penunjang dalam penelitian uji toksisitas minuman kemasan gelas.

3) Aklimatisasi dan Kultur *D. magna*

D. magna didapatkan dari hasil kultur di Balai Lingkungan Keairan Pusat Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Air (PUSAIR) Bandung. Selanjutnya, dikultur di Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Pendidikan Biologi UPI Bandung. *Daphnia magna* dikultur di dalam empat buah aquarium berukuran 40x60 cm menggunakan air tanah.



Gambar 3.2 Aquarium untuk kultur *D. magna*
(Dokumentasi pribadi, 2017)

Metode untuk kultur *D. magna* yang dilakukan berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Surtikanti, dkk. (2017). Langkah-langkah dalam pengulturan adalah menyiapkan air sumur yang sudah didiamkan selama satu minggu, kemudian kultur *D. magna* sebanyak 1,5 L yang berasal dari PUSAIR disebar ke dua aquarium, setelah ada *Neonate* yang lahir dipindahkan ke dua akuairum lainnya. Akuairum diberi aerasi dengan gelembung kecil. Suhu lingkungan sekitar 18-20°C. Pakan yang digunakan adalah fermipan (*yeast*). Sebelum fermipan diberikan, dilarutkan dahulu dengan air. Aklimatisasi dilakukan hingga kultur stabil atau berkembangbiak dengan baik, yaitu secara partenogenesis. Penelitian dapat dilakukan setelah kultur *D. magna* stabil dan jumlah indukan betina yang berisi telur jumlahnya cukup untuk disubkultur.

4) Pembuatan *Freshwater*

Medium yang digunakan untuk kultur *D. magna* harus mengandung Na, K, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , dan HCO_3^- (Adema, 1978). *Freshwater* digunakan untuk subkultur, larutan pengencer sampel minuman, dan medium kontrol dalam penelitian ini. *Freshwater* dibuat dengan cara melarutkan bahan-bahan ke dalam aquadest. Sebelum digunakan, *freshwater* diaerasi selama ± 2 jam. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat satu liter *freshwater* terdiri dari (Surtikanti, dkk. 2017):

- 0,096 g NaHCO_3
- 0,06 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,06 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,004 g KCl
- Satu liter aquadest

3.6.2 Tahap Penelitian

Tahap penelitian pada uji toksisitas ini terdiri dari subkultur *D. magna*, optimasi kontrol, uji pendahuluan (RFT), dan uji lanjutan (DT).

1) Subkultur *D. magna*



Gambar 3.3 Subkultur *D. magna*
(Dokumentasi pribadi, 2018)

Subkultur dilakukan untuk mendapatkan neonate *D. magna* yang berusia < 24 jam. Subkultur dilakukan dengan cara memindahkan betina berisi telur yang sudah terlihat siap lahir ke gelas beaker 250 ml yang berisi *freshwater*. Sebelum *freshwater* digunakan, diaerasi dahulu selama 2 jam. Betina yang berisi telur terlihat titik-titik hitam di bagian posteriornya dan ukuran tubuhnya lebih besar.

Sebelum 24 jam, neonate *D. magna* yang sudah lahir siap dipakai untuk uji toksisitas (Surtikanti, dkk. 2017).

2) Optimasi kontrol

Penelitian uji toksisitas ini menggunakan metode uji hayati statis, sehingga sebelum penelitian perlu dilakukan percobaan optimasi kontrol atau untuk mengetahui jangka waktu *neonate D. magna* dapat bertahan hidup tanpa diberi makan dan pergantian medium (Surtikanti, 2011). Percobaan ini menentukan lama waktu untuk pengamatan uji toksisitas akut pada penelitian ini. Medium yang digunakan sama dengan medium kontrol, yaitu *freshwater*. Sebelum digunakan, *freshwater* diaerasi dahulu selama dua jam.

Sebelum percobaan ini dilakukan, subkultur dilakukan untuk mendapatkan *neonate D. magna*. Kemudian *neonate* yang berusia kurang dari 24 jam dimasukkan ke dalam botol vial yang berisi 10 ml *freshwater*, masing-masing diisi 10 ekor *neonate*. Percobaan ini menggunakan lima botol vial dan dilakukan sebanyak tiga kali di waktu yang berbeda. Pengamatan mortalitas *D. magna* dilakukan setiap 24, 48, dan 72 jam.

3) Uji Pendahuluan (RFT)

Uji pendahuluan dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi kritis, yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian seluruh *neonate D. magna* dan konsentrasi terendah yang menyebabkan *neonate D. magna* mati. Uji ini menggunakan rentang konsentrasi yang luas dengan jumlah lima konsentrasi disertai kontrol. Konsentrasi yang digunakan dalam uji ini adalah 0.01, 0.1, 1, 10, 100, dan 0% sebagai kontrol (USEPA, 1994). Pengenceran dilakukan menggunakan rumus $M_1.V_1 = M_2.V_2$. Dilakukan pengulangan sebanyak lima kali untuk setiap konsentrasi. Setiap botol vial diisi 10 ml larutan uji dan 10 ekor *neonate D. magna* yang berusia kurang dari 24 jam. *Neonate* dipindahkan menggunakan pipet dengan sangat berhati-hati.

Lama waktu pada uji RFT dan DT berdasarkan pada hasil percobaan optimasi kontrol. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam. Jumlah *neonate D. magna* yang mati pada setiap vial jam dicatat. Pengukuran parameter fisik-kimiawi, yaitu suhu

dan pH dilakukan pada awal dan akhir penelitian. Penyimpangan suhu tidak boleh melebihi 2°C. Uji pendahuluan dilakukan sebanyak tiga kali, pada waktu atau minggu yang berbeda. Satu kali pengujian membutuhkan waktu selama empat hari.

4) Uji Lanjutan (*DT*)

Uji lanjutan dilakukan untuk mendapatkan nilai LC_{50} – 24 dan 48 jam. Uji ini dilakukan setelah uji pendahuluan. Prosedur pada uji ini sama dengan prosedur uji pendahuluan, tetapi konsentrasi yang digunakannya berbeda. Uji ini menggunakan rentang konsentrasi yang lebih sempit. Konsentrasinya ditentukan dari hasil uji pendahuluan berdasarkan dari tabel seri logaritma (tabel 3.1). Apabila konsentrasi kritis hasil uji pendahuluan terdapat diantara konsentrasi 1 dan 10%, maka konsentrasi yang digunakan berdasarkan tabel seri logaritma adalah 22; 32; 46; 68% dan kontrol 0% (EPS, 1990). Pengulangan pada setiap konsentrasi dilakukan sebanyak lima kali. Uji lanjutan pada uji toksisitas ini dilakukan sebanyak tiga kali dalam waktu yang berbeda, satu kali pengujian membutuhkan waktu selama empat hari.



Gambar 3.4 Penempatan vial pada tahap RFT dan DT
(Dokumentasi pribadi, 2018)

Tabel 3.1

Seri Logaritma untuk Penentuan Konsentrasi pada Uji Toksisitas

Jumlah Konsentrasi Antara 100 dan 10 atau 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

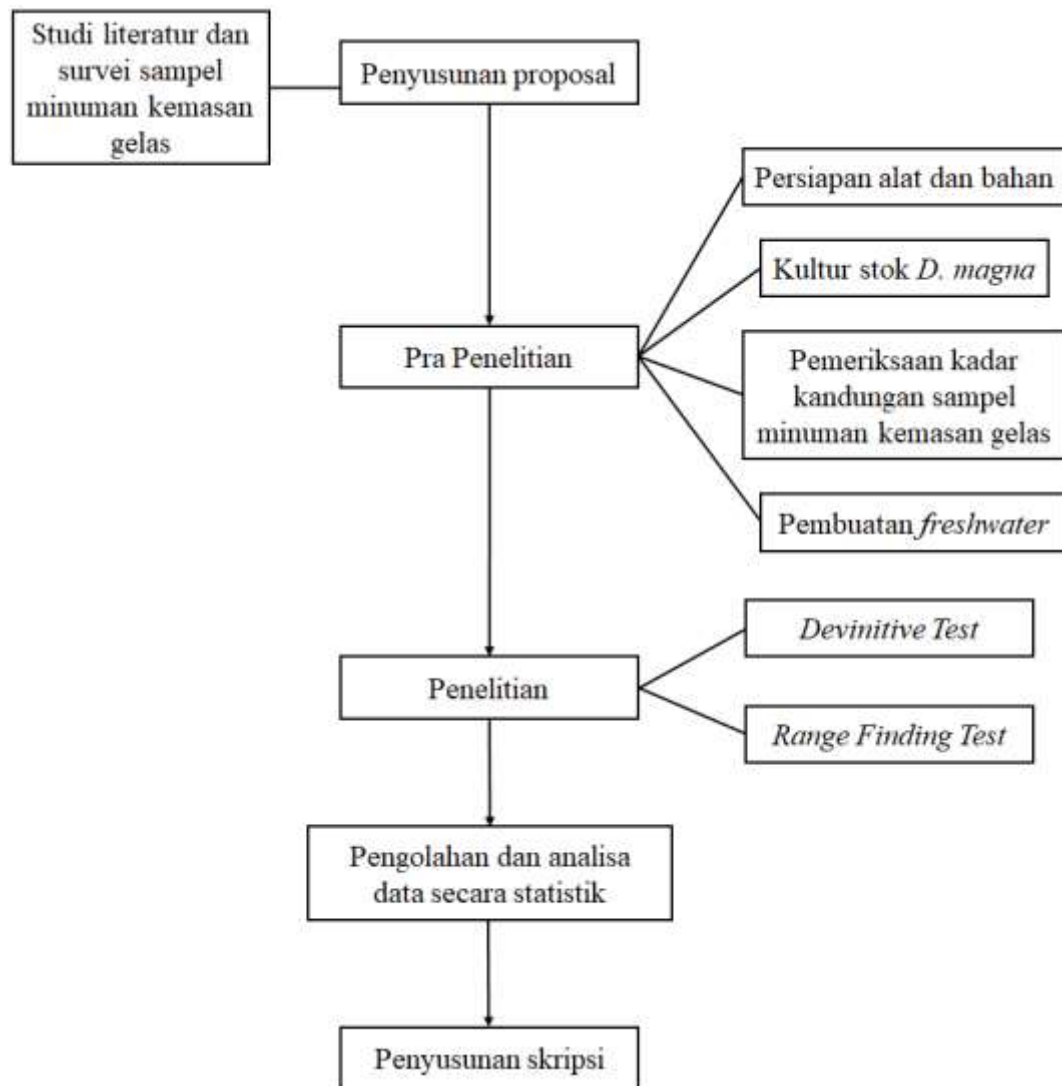
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	52,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

Sumber: EPS, 1990

3.7 Analisis Data

Data hasil pengamatan uji lanjutan pada 24 dan 48 jam diolah menggunakan metode Probit untuk mendapatkan nilai LC_{50} dan uji Dunnett untuk mendapatkan nilai NOEC dan LOEC (USEPA, 2002). Pengolahan data dilakukan menggunakan *software* IBM SPSS 22.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.5 Bagan Alur Penelitian