

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian LPWP (Lembaga Pengembangan Wilayah Pantai), Universitas Diponegoro Jepara.

Waktu penelitian dimulai bulan Agustus sampai bulan September 1994.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan.

- a. Larva udang Windu stadium mysis .
- b. Antibiotik Minosiklin
- c. Pakan larva udang Windu stadium mysis, yang terdiri pakan alami dan pakan buatan
- d. Seperangkat bahan kimia untuk tetraisi kadar oksigen dan kadar amoniak.
- e. Aquades
- f. Pupuk untuk kultur *Skeletonema costatum*
- g. Chlorine 150 ppm dan Natrium tiosulfat 20 ppm
- h. Chlorine 60 ppm

2. Alat.

- a. Stoples 3,5 l
- b. Termometer
- c. Refraktometer
- d. Kertas pH
- e. Seperangkat untuk perlengkapan aerasi

- f. Gelas ukur
- g. Timbangan elektrik
- h. pipet hisap
- i. Pipet tetes
- j. Heater statis
- k. Mikroskop

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode "static bio-assay" (Sprague, 1973) Rancangan percobaan yang digunakan Rancangan Acak Lengkap, dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan.

Parameter yang diukur, dihitung, dan diamati adalah panjang total, jumlah larva yang hidup, dan berat basah larva, serta kualitas media pemeliharaan.

D. Cara Kerja

1. Persiapan alat penelitian.

Tempat uji. Tempat uji yang digunakan pada penelitian ini (tahap pendahuluan, tahap penentuan LC_{50} - 48 jam, tahap uji persistensi, dan tahap penentuan konsentrasi sublethal adalah stoples 3,5 liter. Setiap stoples hanya diisi air laut sebanyak 2 liter. Stoples disterilisasi dengan cara direndam menggunakan chlorine 150 ppm, dan dinetralisasi dengan menggunakan natrium tiosulfat 60 ppm, masing-masing selama 24 jam atau sampai bau chlorine hilang.

Peralatan aerasi. Untuk mengusahakan agar tekanan udara sama, maka digunakan batu aerasi yang ukurannya sama, digunakan pengatur aerasi, dan dihubungkan dengan selang yang sama panjang.

Selang aerasi, batu aerasi dan pengatur aerasi setiap akan digunakan disterilisasi dengan cara direndam menggunakan chlorine 150 ppm, selanjutnya dinetralisasi, dengan menggunakan Natrium tiosulfat 60 ppm masing-masing selama 24 jam.

2. Persiapan bahan penelitian.

Pengadaan larva udang Windu. Larva yang digunakan dalam setiap tahap penelitian masih stadium mysis. Larva dipelihara sejak stadium nauplius, yang diperoleh dari pembenihan skala rumah tangga di sekitar LPWP, Jepara. Setiap tahap penelitian dipergunakan larva yang berasal dari satu induk dan belum dikenai perlakuan. Hewan uji yang digunakan 25 ekor/liter.

Persiapan pakan. Pakan yang digunakan untuk pemeliharaan larva selama penelitian adalah pakan alami dan pakan buatan. Pakan alami yang diberikan larva stadium mysis, yaitu *Skeletonema costatum*, pakan alami diperoleh dengan mengkultur plankton tersebut. Pakan buatan yang diberikan larva *Penaeus monodon* stadium mysis, adalah kombinasi antara Spirulina kering dan BP dengan perbandingan 2 : 3, setiap kali

pemberian adalah 1 ppm (Komunikasi pribadi dengan H.M. Sajad, 1994).

Selama penelitian pakan buatan diberikan setiap 4 jam sekali yaitu : pukul 14.00 WIB., 18.00 WIB., 22.00 WIB., 02.00 WIB., 06.00 WIB., 10.00 WIB., sedang pakan alami diberikan diberikan 2 kali sehari yaitu jam 12.00 WIB dan 24.00 WIB.

Persiapan media pemeliharaan larva. Sebagai media pemeliharaan larva dalam penelitian ini digunakan air laut dari penampungan utama Lembaga Pengembangan Wilayah Pantai, Jepara. Air diambil dari laut melalui filter pompa. Sebelum air laut digunakan untuk media pemeliharaan larva, akan disterilisasi dengan Chlorine 60 ppm, dan dinetralisasi dengan Natrium tiosulfat 20 ppm, masing-masing selama 24 jam.

Pengadaan antibiotik. Untuk penelitian ini menggunakan antibiotik Minosiklin, yang diproduksi oleh PT. Phaphros Semarang, dengan nama dagang Minocin.

Untuk mempermudah pembuatan larutan antibiotik sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki, maka dibuat larutan stok untuk setiap tahap penelitian :

- Uji pendahuluan, larutan stok 100 ppm dengan volume 700 ml.
- Uji penentuan LC_{50} - 48 jam, larutan stok 300 ppm dengan volume 200 ml.

- Uji persistensi, larutan stok 200 ppm dengan volume 300 ml.
- Uji utama, larutan stok 200 ppm dengan volume 100 ml.

3. Tahap-tahap penelitian.

Penelitian ini dilakukan 4 tahap, yaitu :

Tahap I. (Uji pendahuluan). Uji ini digunakan untuk menentukan kisaran konsentrasi kritis (Doudoroff, 1951 dalam Wardoyo, 1977).

Penentuan kisaran konsentrasi kritis, menggunakan dosis antibiotik dengan kelipatan 10, yaitu : 0,01 ppm., 0,1 ppm., 1 ppm., 10 ppm., 100 ppm (Wardoyo, 1977). Tahap ini juga disebut sebagai tahanan penentuan konsentrasi LC_0-48 jam dan $LC_{100}-24$ jam. LC_0-48 jam adalah konsentrasi yang mematikan hewan uji sebanyak 0 % dalam waktu 48 jam, dan $LC_{100}-24$ adalah konsentrasi yang mematikan hewan uji sebanyak 100 % dalam waktu 24 jam (Toni, 1985). Masing-masing perlakuan dilakukan dengan ulangan 3 kali, dan kematian larva dicatat setelah 24 dan 48 jam.

Tahap II. Untuk menentukan nilai $LC_{50}-48$ jam. Konsentrasi $LC_{50}-48$ jam adalah konsentrasi yang mematikan hewan uji sebanyak 50 % dalam waktu 48 jam (Sprague, 1973,).

Penentuan konsentrasi pada uji ini menggunakan konsentrasi antara LC_0-48 jam dan $LC_{100}-24$ jam

Konsentrasi untuk penentuan nilai LC_{50-48} jam ditetapkan dengan menggunakan metoda Duodoroff et al. dalam Wardoyo, 1977 yang mempunyai persamaan sebagai berikut :

$$1. \quad \frac{a}{n} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{e}{d} = \frac{x}{e} = \dots \frac{N}{x} \dots (1)$$

$$2. \quad \log \frac{N}{n} = k \log \frac{a}{n} \dots (2)$$

dimana :

N = konsentrasi ambang atas (ppm)

n = konsentrasi ambang bawah (ppm)

a = konsentrasi terkecil yang dikehendeki setelah ambang bawah (ppm)

k = jumlah perlakuan yang dikehendeki

b, c, d, \dots, x = konsentrasi yang dikehendeki (ppm)

Pada uji ini masing-masing perlakuan dengan pengulangan 3 kali, setelah 48 jam dari pemasukan hewan uji ke dalam media uji yang telah diketahui, jumlah hewan uji yang mati dicatat. Selanjutnya menentukan konsentrasi $LC_{50} - 48$ jam menurut petunjuk Hubert, (1980).

Tahap III. Pada tahap ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui daya kerja antibiotik terhadap hewan uji. Konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi ambang atas. Hewan uji yang berada dalam setiap media uji dari pemasukan dibiarkan selama 24 jam, selanjutnya dicatat jumlah hewan uji yang mati.

Tahap IV. tahap ini menentukan pengaruh sublethal antibiotik terhadap daya kelangsungan hidup larva. Pada uji ini juga dihitung panjang total dan berat basah larva serta kualitas air pemeliharaan hewan uji setelah perlakuan selama 96 jam. Kualitas air yang diukur meliputi, suhu, pH, salinitas, oksigen terlarut, dan kadar amoniak. konsentrasi yang digunakan adalah 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, dan 75 % dari konsentrasi LC₅₀ - 48 jam.

3. Pengamatan parameter

Persentase hewan uji yang hidup, adalah jumlah yang hidup selama penelitian tahap ke IV dihitung.

Perhitungan persentase hewan uji yang hidup dengan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Daya kelangsungan hidup hewan uji (\%)} = \frac{H_2}{H_1} \times 100 \%$$

Dimana :

H_1 = jumlah hewan uji mula - mula

H_2 = jumlah hewan uji yang hidup

Panjang hewan uji. Pengukuran panjang total larva menurut Naamin, (1975) adalah sebagai berikut : panjang total diukur dari ujung rostrum sampai ujung telson.

Cara pengukuran, penggaris yang akan digunakan untuk mengukur larva diletakkan di bawah cawan yang berisi hewan uji, dicatat panjang larva pada awal penelitian dan akhir penelitian. Pengukuran panjang awal diambil

sampel sebanyak 30 % dari hewan uji, akhir penelitian semua hewan uji yang hidup diukur semua.

Persamaan untuk mendapatkan pertambahan panjang rata - rata adalah sebagai berikut :

$$P = \frac{P_2 - P_1}{x}$$

dimana :

x : Jumlah hewan uji

P₂ : Panjang total akhir larva (mm)

P₁ : Panjang total awal larva (mm)

Berat basah hewan uji. Hewan uji ditimbang secara keseluruhan baik sebelum maupun sesudah penelitian.

Cara penimbangan adalah sebagai berikut :

Gelas ukur yang berisi air laut 25 ml ditimbang, beratnya sebagai (B₁), kemudian hewan uji yang akan ditimbang dimasukkan ke dalam (B₁), sehingga diperoleh berat total yang baru (B₂), Maka persamaan untuk mendapatkan berat hewan uji rata - rata adalah sebagai berikut :

$$\text{Berat hewan uji rata - rata (mg)} = \frac{B_2 - B_1}{x}$$

dimana :

B₁ = berat gelas ukur yang hanya berisi air laut

B₂ = berat gelas ukur yang berisi air laut dan hewan uji

X = jumlah hewan uji yang ditimbang

Suhu media pemeliharaan . Pengukuran dilakukan

pada awal dan akhir penelitian, selama penelitian suhu dipertahankan dengan menggunakan heater statis pada suhu 30°C . Pengukuran dilakukan dengan menggunakan termometer air raksa yang mempunyai ketelitian $0,5^{\circ}\text{C}$. Salinitas media pemeliharaan, Pengukuran salinitas pemeliharaan dilakukan awal dan akhir penelitian, dengan menggunakan refraktometer yang mempunyai ketelitian $0,5$ permil. Cara pemakaian alat tersebut adalah, : setetes media pemeliharaan larva ditempatkan pada prisma alat tersebut. kemudian bagian prisma diarahkan ke cahaya yang cukup, dengan maksud untuk melihat bidang perbatasan gelap dan terang yang menunjukkan besarnya salinitas.

Pengukuran oksigen terlarut. Pengukuran oksigen yang terlarut (DO) dengan menggunakan modifikasi metoda Winkler, cara pengukuran :

1. Pindahkan air sampel ke botol BOD volume 60 ml sampai meluap, (jangan sampai terjadi gelembung udara) tutup kembali dengan rapat.
2. Tambahkan asam sulfamic 5 tetes dengan pipet, tutup dan aduk dengan membolak - balik botol .
3. Tambahkan MnSO_4 dan pereaksi oksigen masing - masing 10 tetes dengan pipet. Tutup dengan hati - hati dan aduk dengan membolak - balik botol, sampai terbentuk endapan coklat.
4. Tambahkan H_2SO_4 pekat dengan pipet, tutup hati -

hati, dan diaduk hingga endapan semua larut.

5. Ambil air sampel tersebut dengan menggunakan gelas kemudian dimasukkan dalam erlemeyer, jangan sampai terjadi aerasi.
6. Tetrasisi air sampel (No. 5) dengan Na - thiosulfat hingga terjadi perubahan warna dari kuning tua ke kuning muda.
7. Tambahkan 5 - 6 tetes amyllum hingga terbentuk warna biru, lanjutkan tetrasisi dengan Na - thiosulfat hingga tidak berwarna (jernih).

Perhitungan :

$$\text{mgO} / \text{L} = \frac{(\text{ml titran}) \times 0,025 \text{ N} \times 8 \times 1000}{(\text{ml sampel}) \times (\text{ml btl BOD} - \text{ml reagen})}$$

ml btl BOD

(Hariyadi, 1992)

pH . Pengukuran pH dengan menggunakan kertas lakmus. Cara penggunaan : kertas lakmus dimasukkan dalam media uji, perubahan warna yang terjadi pada kertas tersebut, dicocokkan dengan warna pH standar.

Amoniak . Pengukuran kadar amoniak dengan menggunakan Hanna test kid metode kolorimetri.

E. Analisa Data

Data yang diperoleh dari perhitungan dan pengukuran larva yang hidup pada akhir uji utama dianalisa dengan analisa varian menggunakan uji F

yang dilanjutkan dengan uji HSD.

