

IV. METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

Bibit murni *C. calcitrans* yang diperoleh dari bagian kultur makanan alami Balai Budidaya Air Payau Jepara; Media kultur, berupa campuran air laut dan air tawar, bersalinitas 25 ‰; KNO_3 100 ppm; NaH_2PO_4 10 ppm; FeCl_3 1 ppm; Na_2SiO_3 3 ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm; EDTA 5 ppm; Klorin 150 ppm; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 40 ppm; Na_2CO_3 0,045 N; Indikator PP; MnSO_4 ; Sulfamic Acid; H_2SO_4 pekat; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N; Indikator Amylum; NaOH + KI; Deterjen.

Sedangkan alat-alat yang digunakan adalah :

Botol tembus cahaya berkapasitas 3,5 liter; Lampu TL 40 watt; Luxmeter; Refraktometer; Termometer; pH paper; Haemocytometer; Hand tally counter; Mikroskop; Kertas saring Whatman Ashless 20; Timbangan elektrik Sartorius; Selang aerasi; Pipet; Gelas ukur; Alat titrasi; Botol BOD; Erlenmeyer; Oven; Desikator; Corong plastik; Kapas; Label.

B. Cara Kerja

1. Air laut dan air tawar disaring terlebih dahulu dengan menggunakan kapas. Kemudian disterilkan dengan jalan merebus air tersebut hingga mendidih selama kurang lebih 10 menit. Untuk mengatur agar

salinitas media kultur sesuai dengan yang diinginkan, maka dilakukan pencampuran antara air laut dan air tawar yang telah disterilkan. Pencampuran ini berdasarkan rumus dari Svedrup (1942), yaitu apabila a liter air laut yang salinitasnya S_1 permil, akan diencerkan dengan menambahkan n liter air tawar, maka salinitasnya menjadi :

$$S_2 = \frac{a \cdot S_1}{(n + a)} \quad (\text{Svedrup, 1942})$$

dimana, S_1 : salinitas air laut mula-mula (permil)
 S_2 : salinitas air campuran (permil)
 a : volume air mula-mula S_1 (liter)
 n : volume air tawar yang digunakan untuk pengenceran (liter)
 $(n+a)$: volume air campuran (liter)

Untuk mendapatkan media kultur yang salinitasnya benar-benar tepat, maka air campuran yang diperoleh dengan menggunakan rumus diatas, hasilnya diukur lagi dengan memakai alat refraktometer.

2. Alat-alat yang berupa botol tembus cahaya, selang aerasi, pipet, gelas ukur dan corong plastik juga disterilkan, dengan cara dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air sampai bersih. Kemudian dibilas dengan larutan khlorin 150 ppm dan dibiarkan kering selama kurang lebih 1 jam. Lalu dibilas dengan

larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 40 ppm, dan dibilas dengan air tawar sampai hilang bau khlorinnya. Kemudian dikeringkan.

3. Botol diisi dengan media kultur bersalinitas 25‰ yang telah disterilkan sebanyak 3 liter, dan ditambahkan senyawa KNO_3 100 ppm, NaH_2PO_4 10 ppm, FeCl_3 1 ppm, EDTA 5 ppm.

Perlakuan terdiri dari lima macam, yaitu :

Perlakuan A tanpa senyawa Na_2SiO_3 (0 ppm)

Perlakuan B ditambahkan senyawa Na_2SiO_3 3 ppm

Perlakuan C ditambahkan senyawa Na_2SiO_3 6 ppm

Perlakuan D ditambahkan senyawa Na_2SiO_3 9 ppm

Perlakuan E ditambahkan senyawa Na_2SiO_3 12 ppm

Pengulangan untuk masing-masing perlakuan adalah empat kali.

4. Botol tempat media kultur diberi aerasi, kemudian ditebari bibit murni *C. calcitrans* sebanyak 100.000 sel/ml. Untuk menghitung berapa volume bibit (inokulum) yang diperlukan, digunakan rumus sebagai berikut :

$$V_1 = \frac{V_2 \times N_2}{N_1} \quad (\text{Hujiman, 1989})$$

dimana, V_1 : volume inokulum yang dibutuhkan (ml)

N_1 : kepadatan sel inokulum per ml (sel/ml)

V_2 : volume air yang dikultur (ml)

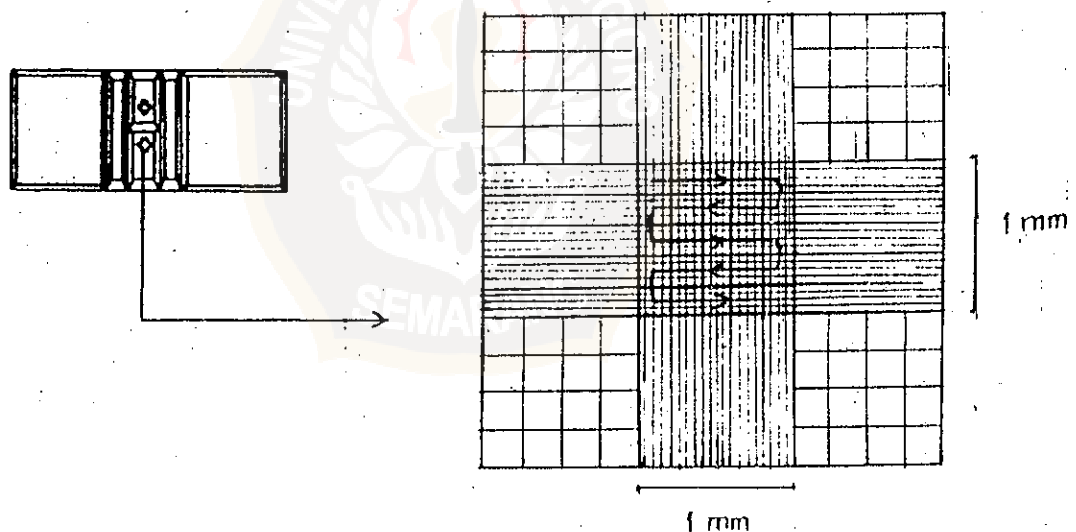
N_2 : kepadatan awal yang diinginkan (sel/ml)

5. Botol disinari lampu TL dengan kekuatan rata-rata 4.000 lux.

6. Perlakuan diamati selama 8 hari. Tiap hari dihitung jumlah selnya dengan alat haemocytometer dan diamati dibawah mikroskop, dibantu dengan alat hand tally counter. Pengambilan sampel dari tiap-tiap botol dilakukan dalam waktu yang sama dengan waktu penebaran bibit *C. calcitrans*.

Haemocytometer berupa lempengan kaca yang berbentuk empat persegi panjang. Luas permukaan bergaris dari haemocytometer yaitu 1 mm^2 dan kedalamannya $0,1 \text{ mm}$. Maka volume air diatas permukaan bergaris adalah $1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$ atau $0,0001 \text{ ml}$.

Jika jumlah sel yang dihitung dalam ruang tersebut adalah N , berarti jumlah sel *C. calcitrans* per ml adalah $N \times 10^4$ (Mujiman, 1989).



Gambar 3. Alat Haemocytometer (Mujiman, 1989).

Keterangan : Penghitungan sel *C. calcitrans* dilakukan pada kotak yang bertanda panah.

7. Tiap hari juga dihitung berat kering sel. Adapun caranya adalah sebagai berikut :

Air media disaring sebanyak 10 ml dengan kertas saring.

Kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan di oven pada suhu 105°C selama kurang lebih 2 jam, hingga beratnya konstan. Sebelum ditimbang, kertas saring didinginkan dalam desikator.

Berat kering sel dihitung dengan rumus :

$$B = \frac{Ba - (Bk + K)}{C} \times 1000$$

(Taras dan Greenberg, 1971).

dimana, B : berat kering sel (gr/l)

Ba : berat kertas saring dan sel alga (gr)

Bk : berat kertas saring (gr)

C : jumlah air media (ml)

K : faktor koreksi

Faktor koreksi (K) didapat dari menyaring air yang salinitasnya sama dengan air media. Kemudian dibilas dengan aquades, dan dioven pada suhu 105°C selama kurang lebih 2 jam, hingga beratnya konstan.

K = berat akhir - berat kertas saring

Dari kepadatan populasi dan berat kering sel didapatkan nilai bobot jenis (mg/sel).

$$\text{Nilai bobot jenis} = \frac{\text{berat kering sel}}{\text{kepadatan populasi}}$$

(Taras dan Greenberg, 1971).

8. Selama penelitian berlangsung, juga dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, salinitas, pH, kandungan O_2 terlarut dan kandungan CO_2 bebas.

Suhu dan salinitas diukur setiap hari, sedangkan pH, kandungan O_2 terlarut dan kandungan CO_2 bebas diukur pada awal dan akhir penelitian.

Adapun pengukuran kandungan O_2 terlarut adalah sebagai berikut :

- a. Botol BOD diisi air sampel sampai penuh, kemudian ditutup kembali.
- b. Ditambahkan 1 ml Sulfamic Acid dengan pipet dibawah permukaan, ditutup dan diaduk dengan membolak-balik botol.
- c. Ditambahkan 2 ml $MnSO_4$ dan 2 ml $NaOH + KI$ dengan memasukkan pipet dibawah permukaan air dalam botol. Ditutup dengan hati-hati dan diaduk dengan membolak-balik botol kurang lebih 20 kali. Dibiarkan beberapa saat hingga endapan coklat terbentuk dengan sempurna.
- d. Ditambahkan 2 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati, diaduk dengan cara yang sama hingga semua endapan

terlarut. Kalau endapan belum larut semua, ditambahkan lagi 0,5 ml H_2SO_4 pekat.

- e. Diambil 100 ml air dari botol BOD tersebut dan dimasukkan kedalam erlenmeyer.
- f. Dititrasi dengan $Na_2S_2O_3$ 0,025 N hingga terjadi perubahan warna dari kuning tua ke kuning muda. Ditambahkan 5 - 8 tetes indikator amylum hingga terbentuk warna biru. Dititrasi lagi dengan $Na_2S_2O_3$ hingga tepat tidak berwarna (bening).

Kadar O_2 terlarut dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar } O_2 \text{ (ppm)} = \frac{\text{ml titran} \times N \text{ titran} \times 8 \times 1000}{\text{ml sampel} \times \frac{(\text{ml btl BOD} - \text{ml reagen})}{\text{ml botol BOD}}}$$

(Hariyadi, Suryadiputra dan Widigdo, 1992).

Sedangkan metode pengukuran kandungan CO_2 bebas adalah sebagai berikut :

- a. 25 ml air sampel dimasukkan kedalam erlenmeyer dengan hati-hati.
- b. Ditambahkan 3 - 4 tetes indikator PP. Jika berwarna pink berarti tidak ada CO_2 . Jika tidak berwarna berarti ada CO_2 dan dilanjutkan ke prosedur c.
- c. Dititrasi segera dengan Na_2CO_3 0,045 N sampai terbentuk warna pink yang stabil selama 30 detik.

Kadar CO₂ bebas dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar CO}_2 \text{ (ppm)} = \frac{\text{ml titran} \times N \text{ titran} \times 44/2 \times 1000}{\text{ml sampel}}$$

(Hariyadi, dkk, 1992).

C. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Percobaan dengan menggunakan pola tunggal dengan rancangan dasar acak lengkap, jumlah perlakuan lima dan masing-masing perlakuan empat kali ulangan.

Model matematis adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} \quad (\text{Srigandono, 1983}).$$

Keterangan :

Y_{ij} = jumlah sel per ml / berat kering sel / bobot jenis pada puncak populasi dengan perlakuan pemberian senyawa Na₂SiO₃ ke i ulangan ke j

μ = nilai tengah dari seluruh perlakuan

α_i = efek pemberian senyawa Na₂SiO₃ ke i

β_{ij} = efek galat pada pemberian senyawa Na₂SiO₃ ke i ulangan ke j

Untuk menunjukkan perlakuan yang berbeda nyata dilakukan uji lanjutan dengan BNT (Beda Nyata Terkecil).