

IV. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Mei 2000 di Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Diponegoro, Semarang.

B. Bahan dan Alat Penelitian

B.1. Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Biakan murni *B. plicatilis* yang diperoleh dari Balai Benih Air Payau (BBAP) Jepara sebagai hewan uji.
- b. Biakan murni *Chlorella* yang diperoleh dari Balai Benih Air Payau (BBAP) Jepara sebagai pakan utama bagi hewan uji.
- c. Ragi roti, yang digunakan sebagai pakan tambahan bagi hewan uji.
- d. Pupuk yang digunakan dalam pembiakan *Chlorella*, dengan komposisi sesuai yang dianjurkan oleh Mujiman (1995) adalah sebagai berikut:

- ZA	100 ppm
- Urea	10 ppm
- TSP	30 ppm
- EDTA	2 ppm
- FeCl ₃	3 ppm
- e. Air laut bersih sebagai media uji.

- f. $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ yang diperoleh dari Lab. Kimia Analitik Jurusan Teknik Kimia UNDIP, sebagai bahan uji.
- g. Aquadest yang digunakan sebagai pelarut bahan-bahan kimia yang digunakan selama penelitian.
- h. Larutan *Chlorin* dan *Natrium tiosulfat* ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) yang digunakan untuk sterilisasi air media dan alat-alat selama penelitian.

B.2. Alat-alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Stoples kaca volume 3 liter untuk wadah stok kultur *B. plicatilis* dan *Chlorella*.
- b. Stoples plastik volume 2 liter untuk wadah pengujian (uji sub letal).
- c. Mangkuk plastik volume 250 ml untuk wadah pengujian (uji pendahuluan dan uji lanjut).
- d. Peralatan aerasi yang meliputi: aerator elektrik, selang dan batu aerasi.
- e. Mikroskop untuk pengamatan hewan uji.
- f. Sedgewick Rafter Counting (SRC) untuk penghitungan kepadatan hewan uji.
- g. Hemositometer dan Hand Counter untuk penghitungan kepadatan *Chlorella*.
- h. Termometer untuk mengukur temperatur air media.
- i. Refraktosalinometer untuk mengukur salinitas air media.
- j. DO meter untuk mengukur kandungan oksigen terlarut air media.
- k. pH meter untuk mengukur pH air media.
- l. Peralatan lainnya yang mendukung penelitian ini, yaitu gelas ukur 1000 ml dan 100 ml, pipet hisap 1 ml dan 10 ml, pengaduk, pipet tetes, beaker glass 100 ml, plankton net $25\mu\text{m}$ dan $60\mu\text{m}$ serta kertas tissue.

C. Cara Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi alat dan media uji

Sterilisasi alat dan media uji dilakukan dengan menggunakan metode dari Djarijah (1995).

1. Sterilisasi alat uji

Alat-alat pengujian yang terdiri dari wadah uji, selang dan batu aerasi, sebelum digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu untuk menghindari kontaminasi dari organisme-organisme yang tidak diinginkan, dengan cara sebagai berikut: alat-alat tersebut dicuci dengan deterjen, selanjutnya direndam dalam larutan *chlorin* 150 ppm selama 1 jam dan dinetralsisir dengan menggunakan larutan *Na-tiosulfat* 60 ppm, kemudian dikeringkan.

2. Sterilisasi media uji

Sebelum dilakukan sterilisasi, air laut terlebih dahulu disaring dengan menggunakan plankton net 25 μ m untuk menghindari adanya kontaminasi plankton dan pengotor lainnya. Untuk sterilisasi air laut sebagai media, dapat dilakukan dengan khlorinasi, yaitu dengan menambahkan larutan *chlorin* 60 ppm. Air diaduk selama beberapa menit kemudian dinetralkan dengan larutan *Na-tiosulfat* 20 ppm.

b. Pengadaan hewan uji

Untuk mendapatkan keseragaman hewan uji, maka dilakukan penyaringan terhadap stok media kultur *B. plicatilis* dengan menggunakan plankton net 60 μ m.

Sebagaimana yang diungkapkan oleh Anonim (1989) bahwa yang dapat lolos dari saringan plankton net 60 μ m adalah individu *B. plicatilis* yang masih muda.

c. Aklimatisasi

Sebelum pengujian, hewan uji terlebih dahulu diaklimatisasi dalam wadah pengujian selama 24 jam pada kondisi laboratorium, yaitu pada salinitas 26-28‰, suhu 25-32°C dan pH 7,7-8,7 dengan aerasi terus menerus. Hal ini seperti yang dilakukan oleh Anonim (1989).

c. Pemberian pakan

Pemberian pakan bagi hewan uji dilakukan pada waktu aklimatisasi dalam wadah pengujian, adapun selama pengujian pemberian pakan dilakukan setiap 2 hari sekali berupa *Chlorella* dengan kepadatan 10⁶ sel/ml dan ragi roti yang diberikan setiap hari sebanyak 100 mg/l. Komposisi pakan ini seperti yang disarankan oleh McVey (1983).

2. Bioassay

a. Uji Pendahuluan

Tahap ini dilakukan untuk mendapatkan nilai ambang bawah, yaitu konsentrasi tertinggi dimana hewan uji masih hidup selama pendedahan 48 jam (LC₀ 48 jam) dan nilai ambang atas, yaitu konsentrasi terendah yang mematikan hewan uji selama pendedahan 24 jam (LC₁₀₀ 24 jam). Pengujian dilakukan pada konsentrasi yang berbeda dengan deret angka secara geometris menggunakan bilangan basis 10 (Anonim, 1983). Konsentrasi yang diperlakukan di sini adalah konsentrasi perlakuan

yang pernah dilakukan oleh Redjeki (1993), yaitu 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 , 10^1 , 10^2 ppm dengan 1 kontrol (0 ppm), masing-masing diulang 3 kali.

Air media yang digunakan sebanyak 100 ml dengan kepadatan hewan uji sebesar 60 individu/ml. Hal ini seperti yang telah dilakukan oleh Savitri dkk. (1998).

Pengamatan terhadap mortalitas hewan uji dilakukan secara bertahap, yaitu pada jam ke-6, jam ke-12, jam ke-24 dan jam ke-48. Jumlah hewan uji yang mati dicatat selama pengamatan. Adapun ciri hewan uji yang mati ditandai dengan tidak adanya pergerakan.

b. Uji Utama

Pada pengujian ini dilakukan 5 taraf perlakuan konsentrasi Pb pada batas antara nilai ambang atas dengan nilai ambang bawah, yaitu diperoleh dengan rumus dari Hubert (1979) dalam Anonim (1983):

$$\text{Log } N/n = k (\text{Log } a/n)$$

dimana: N = nilai konsentrasi ambang atas

n = nilai konsentrasi ambang bawah

a = nilai konsentrasi terkecil yang digunakan dalam tahap ini

k = jumlah konsentrasi yang diujikan

Setelah diperoleh nilai a, konsentrasi selanjutnya dihitung dengan rumus:

$$a/n = b/a = c/b = d/c = e/d = f/e$$

Kelima konsentrasi yang diperoleh kemudian diperlakukan pada hewan uji pada masing-masing wadah pengujian. Air media yang digunakan sebanyak 100 ml dengan kepadatan hewan uji sebesar 60 individu/ml. Hal ini seperti yang dilakukan

oleh Savitri dkk. (1998). Pada kontrol, media uji tidak diberi Pb. Baik pada kontrol maupun perlakuan, masing-masing diulang 3 kali.

Tahap ini berlangsung selama 48 jam, dimana pengamatan terhadap mortalitas hewan uji dilakukan pada jam ke-6, jam ke-12, jam ke-24, jam ke-48.

3. Uji Sub Letal

Konsentrasi Pb yang digunakan adalah konsentrasi sub letal yang diperoleh dari uji utama. Konsentrasi Pb yang diujikan di sini adalah konsentrasi perlakuan sebagaimana yang telah dilakukan oleh Redjeki (1993), yaitu sebesar 0 %, 10%, 25%, 40%, 55% dan 70% dari konsentrasi sub letal. Dari uji pendahuluan dan perhitungan nilai LC_{50} 48 jam diperoleh hasil bahwa konsentrasi sub letal Pb adalah 0,214 ppm (Lampiran 02). Adapun konsentrasi logam Pb yang diujikan adalah 0 ppm (A), 0,021 ppm (B), 0,054 ppm (C), 0,086 ppm (D), 0,118 ppm (E) dan 0,150 ppm (F). Air media yang digunakan sebanyak 1 liter dengan kepadatan hewan uji sebesar 30 individu/ml. Hal ini seperti yang dilakukan oleh Savitri dkk. (1998). Baik pada perlakuan maupun kontrol, masing-masing diulang 3 kali dengan lama pendedahan 10 hari.

Parameter yang diamati adalah jumlah hewan uji yang hidup setiap hari selama waktu pendedahan 10 hari, sehingga dari data ini dapat dibuat grafik pertumbuhan populasi *B. plicatilis*.

D. Parameter Lain yang Diamati

Parameter fisik-kimia yang diamati berupa suhu, pH, salinitas, dan oksigen terlarut (DO) yang dilakukan pada awal dan akhir pengujian.

E. Analisis Data

Penentuan nilai LC_{50} 48 jam dilakukan menggunakan analisis probit dari Bushvine-Nash (Bushvine, 1971 *dalam* Koestoni, 1985).

Rancangan percobaan yang digunakan pada uji sub letal adalah Rancangan Acak Lengkap dengan model ANOVA pada taraf signifikansi 5%. Sedangkan uji lanjutan yang dipakai adalah Uji Beda Nyata Jujur (Srigandono, 1989).

