

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini secara keseluruhan dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 1998 di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro.

B. Parameter Yang Diteliti

B.1. Parameter Utama :

- Pertumbuhan populasi *Chlorella* sp.
- Penurunan konsentrasi Zn

B.2. Parameter Pendukung :

- Salinitas
- Suhu
- Derajat keasaman (pH)
- DO (O₂ terlarut)
- CO₂ bebas

Parameter pendukung diusahakan konstan untuk itu perlu diukur setiap hari.

C. Bahan Dan Alat

C.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai

berikut :

a. Biakan murni *Chlorella* sp. yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Jepara.

b. Seng (Zn) dalam bentuk senyawa $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

c. Air laut sebagai air media

Dipilih air laut karena *Chlorella* sp. yang digunakan adalah dari jenis yang hidup di air laut.

d. Pupuk media (Anonim, 1985)

Pupuk media terdiri dari :

-ZA 10 ppm

- Urea 100 ppm

- TSP 30 ppm

Zat tambahan yang terdiri dari :

- $FeCl_3$ 3 ppm

- EDTA 2 ppm

e. Chlorin

f. Natrium thiosulfat

g. Senyawa kimia untuk menguji CO_2

C.2. Alat-alat

a. Jerigen plastik

b. Aerator elektrik

c. Stoples/bejana dengan kapasitas volume 3 liter

d. Kertas saring

- e. Thermometer
- f. pH meter
- g. DO meter
- h. Lampu TL
- i. Refraktosalinometer
- j. Luxmeter
- k Erlenmeyer
- l. Gelas ukur
- m. Haemocytometer
- n. Mikroskop

D. Cara Kerja

D.1. Persiapan

- a. Persiapan biakan *Chlorella* sp. yang diperoleh dari BBAP Jepara
- b. Persiapan kondisi lingkungan :
 - intensitas cahaya digunakan lampu TL 40 watt sebanyak 3 buah, yang masing-masing menghasilkan cahaya sebesar 2500-4000 lux. Lampu TL dipasang dengan jarak 15 cm dari unit percobaan.
 - salinitas dibuat sebesar 26 permil
 - aerasi dengan menggunakan aerator elektrik
 - pH dibuat 7-8 dan suhu dibuat 27-28°C.

(Hastuti, 1988)

c. Pensterilan alat dan air media

Peralatan yang digunakan dalam penelitian seperti selang aerasi, bejana, pipet, gelas ukur dan lain-lain harus disterilkan dulu. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan chlorin 150 ppm yang dilarutkan dalam air sebanyak 10 liter, kemudian dibilas dengan menggunakan Natrium thiosulfat 60 ppm yang dilarutkan dalam air sebanyak 10 liter (Anonim, 1985). Pada sterilisasi air media dilakukan dengan cara mendidihkan dan kemudian menyaring air tersebut menggunakan kain nilon yang bermata saringan 15 mikron. Saringan ini dapat menahan jasad renik (Hastuti, 1988).

d. Pengukuran konsentrasi Zn mula-mula yang terdapat dalam air laut yang digunakan sebagai air media. Hasil pengukuran ini diperhitungkan dalam menetapkan perlakuan penambahan Zn.

e. Aklimasi *Chlorella* sp.

Sebelum dilakukan penelitian, *Chlorella* sp. terlebih dahulu diaklimasi dalam bejana uji pada kondisi laboratorium sampai mencapai puncak populasi (Hastuti, 1988).

D.2. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mencari kisaran konsentrasi Zn, untuk *Chlorella* sp. agar masih dapat tumbuh. Data yang diperoleh digunakan sebagai dasar untuk menentukan kisaran konsentrasi pada penelitian utama.

Penelitian pendahuluan dilakukan selama 10 hari, dengan lima perlakuan dan tiga kali ulangan. Kepadatan awal dari sel *Chlorella* sp. yang digunakan adalah 100.000 sel/ ml dan perlakuan diberikan pada saat fase

eksponensial (Thongra-ar, 1995). Penghitungan volume inokulum yang diinginkan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$V_1 = \frac{N_2 \times V_2}{N_1}$$

di mana,

V_1 = Volume inokulum yang dimasukkan (ml)

V_2 = Volume medium kultur (ml)

N_1 = Kepadatan stok (sel/ml)

N_2 = Kepadatan sel yang diinginkan

(Martosudarmo dan Wulani,1990)

Menurut Thongra-ar (1995), nilai toksisitas Zn IC 50 terhadap *Dunaliella tertiolecta* adalah 1,13 ppm, maka lima kelompok perlakuan pada penelitian pendahuluan adalah sebagai berikut :

- A. Kontrol (A) : Kultur *Chlorella* sp. dengan konsentrasi Zn awal pada air media (0,0042 ppm)
- B. A + 0,1 ppm dari konsentrasi Zn
- C. A + 0,4 ppm dari konsentrasi Zn
- D. A + 0,7 ppm dari konsentrasi Zn
- E. A + 1.0 ppm dari konsentrasi Zn

D.3. Penelitian Utama

Penentuan perlakuan pada penelitian utama adalah berdasarkan penelitian pendahuluan. Setelah diketahui kisaran konsentrasi Zn dimana *Chlorella* sp. masih dapat tumbuh, kemudian ditentukan kisaran konsentrasi yang lebih sempit dari kisaran konsentrasi tersebut. Kisaran konsentrasi Zn yang diperoleh pada uji pendahuluan ini, dibagi menjadi lima tingkatan perlakuan dan satu kontrol. Keenam perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

- A. Kontrol (A) : Kultur *Chlorella* sp. dengan konsentrasi Zn awal pada air media (0,0042 ppm)
- B. A + 0,05 ppm dari konsentrasi Zn
- C. A + 0,15 ppm dari konsentrasi Zn
- D. A + 0,25 ppm dari konsentrasi Zn
- E. A + 0,35 ppm dari konsentrasi Zn
- F. A + 0,45 ppm dari konsentrasi Zn

Penelitian utama dilakukan selama 10 hari, dengan enam variasi perlakuan dan tiga kali ulangan. Kepadatan awal sel *Chlorella* sp. yang digunakan adalah 100.000 sel/ml. Perlakuan diberikan pada saat hari ke -5 atau pada saat fase eksponensial (Thongra-ar, 1995).

D.4. Pembuatan Larutan Zn (APHA, 1992)

Seng sulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) mempunyai berat molekul 287.56 dan berat atom 65.38. Untuk membuat konsentrasi Zn 1 mg/l (1 ppm), berat $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ yang dibutuhkan adalah sebesar :

$$287.56 \times \frac{1}{65.38} = 4.398 \text{ mg, kemudian ditambah air sampai volume 1 liter.}$$

D.5. Pengumpulan Data

a. Penghitungan jumlah sel *Chlorella* sp.

Penghitungan sel *Chlorella* sp. dilakukan dengan menggunakan haemocytometer dan diamati dengan menggunakan mikroskop. Sampel ditetaskan pada bagian tengah haemocytometer, yang volume pada bagian tengahnya adalah $0,1 \text{ mm}^3$ atau sama dengan $0,0001 \text{ ml}$. Jadi jika jumlah sel yang terhitung adalah = n, maka jumlah sel tiap ml = $n \times 10000$ (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

b. Penghitungan konsentrasi

Penghitungan konsentrasi Zn dilakukan pada air media pada saat akhir penelitian, dengan menggunakan metode Spektrofotometri Serapan Atom (Atomic Absorbtion Spectrophotometry). Metode ini tepat untuk analisa sampel yang mengandung logam berat (Cantle, 1982).

D.6. Pengukuran Parameter Fisik-Kimia

Tabel 1. Pengukuran Faktor Fisik-Kimia

Parameter	Alat	Frekuensi
1. Salinitas	refraktosalinometer	setiap hari
2. Suhu	termometer	setiap hari
3. pH	pH meter	setiap hari
4. DO	DO meter	setiap hari
5. CO ₂	metode Winkler	awal dan akhir

Cara Pengukuran CO₂ bebas (APHA, 1992)

Pengukuran CO₂ bebas dilakukan dengan menggunakan titrasi pada awal dan akhir penelitian dengan tujuan supaya tidak banyak mengurangi volume air media. Mula-mula 100 ml air contoh dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, kemudian ditambahkan 3-5 tetes indikator pp. Setelah itu dititrasi dengan Na₂S₂O₃ 0,0454 N sampai terbentuk warna merah jambu. Volume Na₂S₂O₃ yang digunakan dicatat

$$\text{sebagai } A \text{ ml. Kadar CO}_2 \text{ bebas (ppm)} = \frac{A \times N \times 22000}{100}$$

E. Analisis Data

Pada penelitian ini digunakan pola Rancangan Acak Lengkap. Data dianalisis dengan Analisis of Variance berdasar uji nilai F. Kemudian dilanjutkan uji BNJ. Untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi Zn dengan populasi *Chlorella* sp. maka dilakukan analisis korelasi dan regresi.

