

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium basah dan laboratorium mikrobiologi Program Studi Budidaya Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Gresik pada bulan Desember 2022. Uji logam berat dilakukan di Laboratorium Kimia Departemen Kimia Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

3.2 Material

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat dalam Tabel 1 dan 2 dibawah.

Tabel 1. Alat Penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Cool box (<i>Styterofom</i>)	Sebagai tempat penyimpanan sampel sementara dari lokasi penelitian hingga ke laboratorium
2	Timbangan Digital	Sebagai alat untuk menimbang bobot kerang
3	Alat Kualitas Air (pH, thermometer, refraktometer, dan DO Meter)	Sebagai alat pengukur kualitas air selama proses depurasi
4	Bak Depurasi	Sebagai wadah proses depurasi
5	Kamera	Sebagai alat untuk mendokumentasikan hasil penelitian
6	Pompa Air	Sebagai alat membantu mengisi air dari tendon ke bak depurasi maupun dari bak depurasi ke saluran out put
7	Filter	Sebagai alat penyaring air selama proses depurasi berlangsung
8	Tandon Air	Sebagai tempat menampung air laut
9	Alat Tulis	Sebagai alat untuk mencatat data berupa pulpen, spidol dan kertas.
10	Beker glas	Sebagai alat penunjang dalam proses pembuatan alginat dan dalam proses uji TOM serta bakteri
11	Blender	Sebagai alat penghancur/penghalus rumput laut dalam proses pembuatan alginat

12	Tabung reaksi	Sebagai tempat pengeceran larutan sampel
13	Rak tabung reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi yang sudah terisi sampel uji
14	hot plate dan magnetic stirrer	Sebagai alat pengaduk atau membantu menghomogenkan larutan dengan bahan
15	Spatula	Sebagai alat untuk memudahkan dalam pengambilan bahan-bahan kimia
16	Erlenmeyer	Sebagai alat penunjang dalam proses ekstraksi alginat dan uji TOM
17	Centrifuge	Sebagai alat pemisah sampel menjadi dua fase, dengan memutarnya pada kecepatan tinggi
18	Pipet ukur	Sebagai alat pengukur larutan dalam skala kecil
19	Gelas ukur	Sebagai alat pengukur larutan dalam skala lebih besar dari pipet
20	Cawan petri	Sebagai tempat media penanaman dalam uji total bakteri
21	Hand tally counter	Sebagai alat pembantu dalam perhitungan koloni bakteri
22	Bunsen	Sebagai alat untuk mencegah kontaminan dalam penanaman bakteri
23	Spreader	Sebagai alat untuk meratakan sampel dalam penanaman bakteri
24	mesin AAS	Sebagai alat dalam uji kadungan logam berat timbal (Pb)
25	Oven	Sebagai alat pengering alginat
26	Blower	Untuk aerasi tandon air laut dalam proses sterilisasi

Tabel 2. Bahan Penelitian

No	Bahan Material	Fungsi
1	Kerang Hijau	Sebagai hewan uji sampel penelitian
2	Rumput laut Sargassum	Sebagai bahan baku dalam pembuatan alginat
3	Batu Zeolit	Sebagai filter kimia dalam proses depurasi
4	Pasir silika	Sebagai filter kimia dalam proses depurasi
5	HCl	Untuk memecah dinding sel rumput laut sehingga memudahkan dalam ekstraksi alginat
6	NaOH	Sebagai bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi alginat
7	Na ₂ CO ₃	Untuk membantu mendegradasi asam alginat dan memotong rantai polimer

8	CaCl ₂	Membantu proses pemucatan dalam ekstraksi alginat
9	Isopropanol	Membantu mengikat kadar air dalam proses pengeringan alginat
10		
11	KMnO ₄	Sebagai bahan dalam proses uji TOM
12	Batu didih	Mempercepat proses pendidihan dalam proses uji TOM
13	Asam sulfat (H ₂ SO ₄)	Sebagai bahan dalam proses uji TOM
14	Asam Oksalat (H ₂ C ₂ O ₄)	Sebagai bahan dalam proses uji TOM
15	Na-tiosulfat	Untuk menetralkan kaporit dalam sterilisasi air
16	Na-fisiologis	Sebagai bahan pengenceran sampel dalam uji bakteri
17	Plate Count Agar (Merck)	Sebagai media dalam uji total bakteri
18	Spirtus	Sebagai bahan bakar
19	Gas asitelin	Membantu proses pembakaran dalam proses uji kandungan logam berat timbal
20	Air Laut	Sebagai media budidaya kerang selama proses depurasi
21	Kaporit	Sebagai sterilisasi air laut
22	Kertas label	Sebagai penanda setiap sampel kerang hijau
23	Tissue	Untuk membersihkan peralatan penelitian

3.3 Kerangka Penelitian

3.3.1 Perlakuan Penelitian

Perlakuan dalam penelitian ada 2 yaitu **penambahan ekstrak kasar alginat dalam filter depurasi kerang hijau dan filter tanpa penambahan ekstrak kasar alginat**. Setiap perlakuan dilakukan 2 pengulangan dengan 3 variabel pengujian.

3.3.2 Setting wadah Depurasi Kerang Hijau

Teknik depurasi kerang hijau dilakukan dengan tujuan eliminasi kontaminan yang berupa mikroba, dan residu bahan toksik. Hasil penelitian sebelumnya tentang depurasi melaporkan bahwa lama depurasi dalam dua hari dengan penggunaan sinar UV dan perlakuan perendaman dapat mengeliminasi logam berat merkuri hingga 32.2% dalam waktu 6 hari depurasi (Anacleto *et al.* 2015).

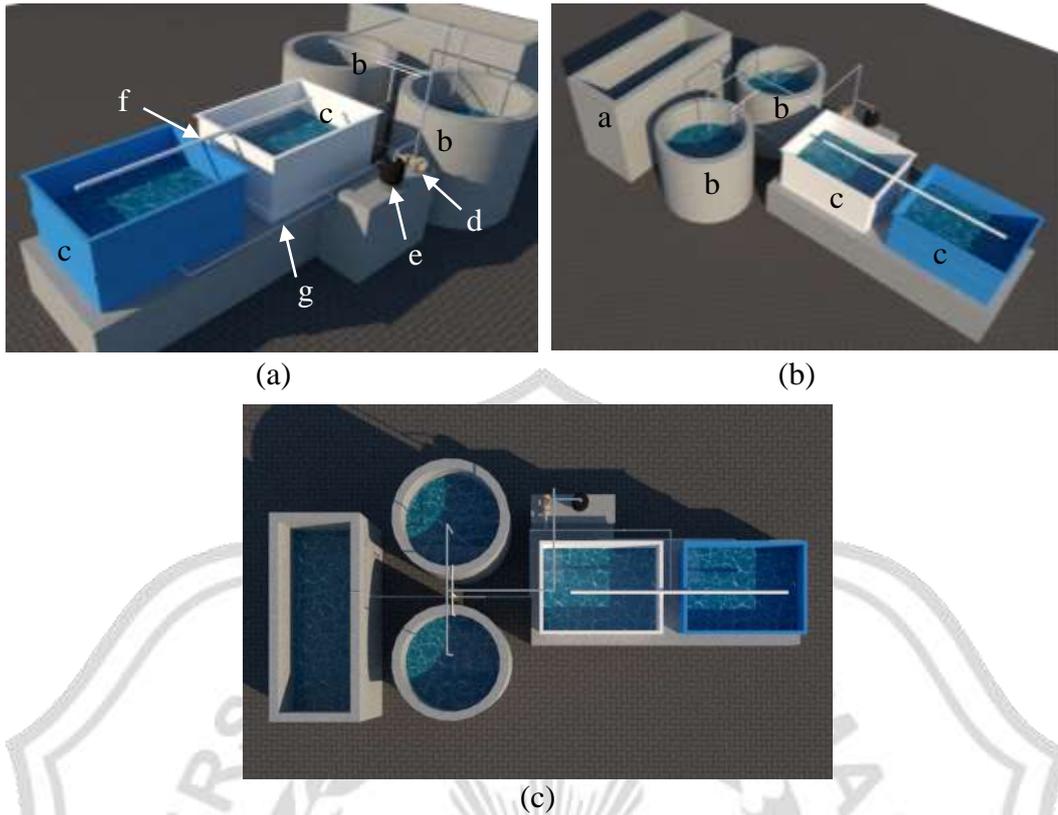
Penelitian depurasi kerang hijau dilakukan selama 16 jam hal ini mengacu pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Aminin *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa depurasi dalam waktu 16 jam merupakan waktu yang efektif dalam

menurunkan kadar logam berat, kadar logam berat Pb dalam 16 jam mengalami penurunan sebesar 59% dari 0,66 ppm menjadi 0,27 ppm.

Proses perakitan wadah depurasi dimulai dari persiapan semua komponen untuk depurasi yang meliputi bak fiber, rak kontainer, pipa kran, filter air, dan *flow* meter. Bak fiber yang digunakan memiliki ukuran 100 cm x 100 cm x 60 cm dengan kapasitas 600 L dan rak ukuran 90 cm x 50 cm x 10 cm dengan kapasitas 5-7 kg untuk wadah kerang hijau disterilisasi terlebih dahulu dengan tujuan menghilangkan bakteri kontaminan. Satu bak fiber depurasi dengan kapasitas 600L dapat menampung 4 susun wadah atau rak kerang hijau untuk proses depurasi.

Proses depurasi kerang hijau (*Perna viridis*) yang dilakukan dalam penelitian dimulai dari sterilisasi air laut. Air laut yang sudah steril dipompa dan dialirkan pada bak depurasi kerang hijau. Kerang hijau yang sudah tersusun di rak dimasukkan kedalam bak depurasi yang sudah terisi air laut. Selanjutnya, proses sirkulasi air dalam proses depurasi siap dilakukan dan depurasi berjalan selama 16 jam. Selama proses depurasi berlangsung setiap 2 jam sekali air mengalami pergantian, hal ini dilakukan untuk mencegah tingkat kematian pada kerang yang didepurasi.

Depurasi ini dilakukan dengan 2 perlakuan yaitu **perlakuan A (depurasi dengan filter ekstrak algiant)** dan **perlakuan B (depurasi filter tanpa alginat/kontrol)**, serta depurasi ini juga dilakukan dengan 2 kali ulangan. Proses depurasi dilakukan dengan 4 laju karena memakai 2 perlakuan dan 2 ulangan, laju proses depurasi yang pertama yaitu proses depurasi dengan perlakuan penambahan alginate pada filter kimia (perlakuan A). Laju yang kedua proses depurasi dilakukan dengan perlakuan filter kimia tanpa tambahan alginate (perlakuan B), laju yang kedua dengan laju yang pertama diberi jeda waktu 1 hari hal ini dilakukan untuk persiapan proses depurasi dengan perlakuan B. Laju proses depurasi yang ketiga yaitu proses depurasi dengan perlakuan filter kimia tanpa ekstrak alginat (perlakuan B). Laju depurasi yang keempat yaitu proses depurasi dengan perlakuan penambahan alginate pada filter kimia (perlakuan A), laju yang ketiga dengan laju yang keempat diberi jeda waktu 1 hari hal ini dilakukan untuk persiapan proses depurasi dengan perlakuan A. Berikut adalah setting wadah depurasi kerang hijau selama penelitian:



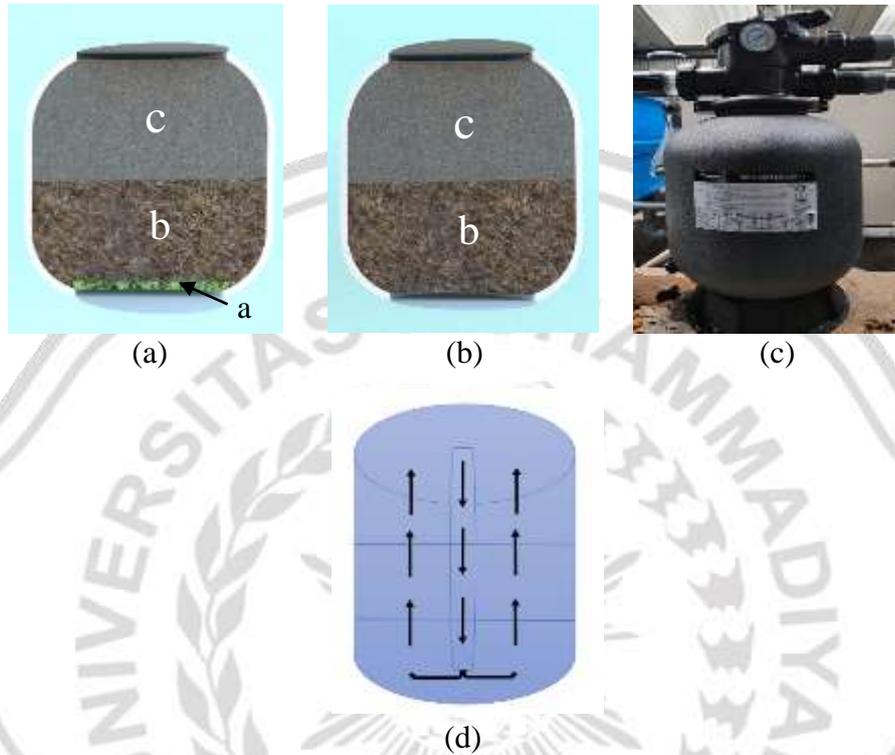
Gambar 6. Setting wadah depurasi kerang hijau (a) tampak samping kanan (b) tampak samping kiri (c) tampak atas

- Keterangan :
- a. tandon airlaut
 - b. bak penampung air limbah
 - c. bak depurasi
 - d. pompa depurasi
 - e. filter depurasi
 - f. pipa saluran input
 - g. pipa saluran output

3.3.3 Setting Filter Alginat

Filter yang digunakan dalam proses depurasi kerang hijau (*Perna viridis*) yaitu filter kimia dan filter kimia yang ditambahkan Alginat. Susunan filter perlakuan A (filter kimia yang ditambahkan ekstrak alginat) dengan dari bagian atas diisi dengan partikel yang paling besar, yaitu batu zeolit, Pasir silika, dan ekstrak alginat. Konsentrasi ekstrak alginat sebesar 40%/L (Chotimah *et al*, 2016), konsentrasi tersebut adalah sebesar 1,25% dari kapasitas tabung filter volume 20kg. Konsentrasi filter batu zeolit dan pasir silika yang bias diguankan adalah sebesar masing-masing 49,38% dari 20 kg yaitu 9,88 kg. Ekstrak alginat yang dijadikan

filter pada depurasi ini berupa serbuk yang halus sehingga sebelum digunakan sebagai filter alginat dapat dibungkus dengan kertas saring dan dilapisi kembali dengan kain saring hal ini dilakukan untuk mencegah larutnya ekstrak alginat dalam air dalam proses depurasi. Berikut adalah gambar setting filter untuk depurasi kerang hijau:

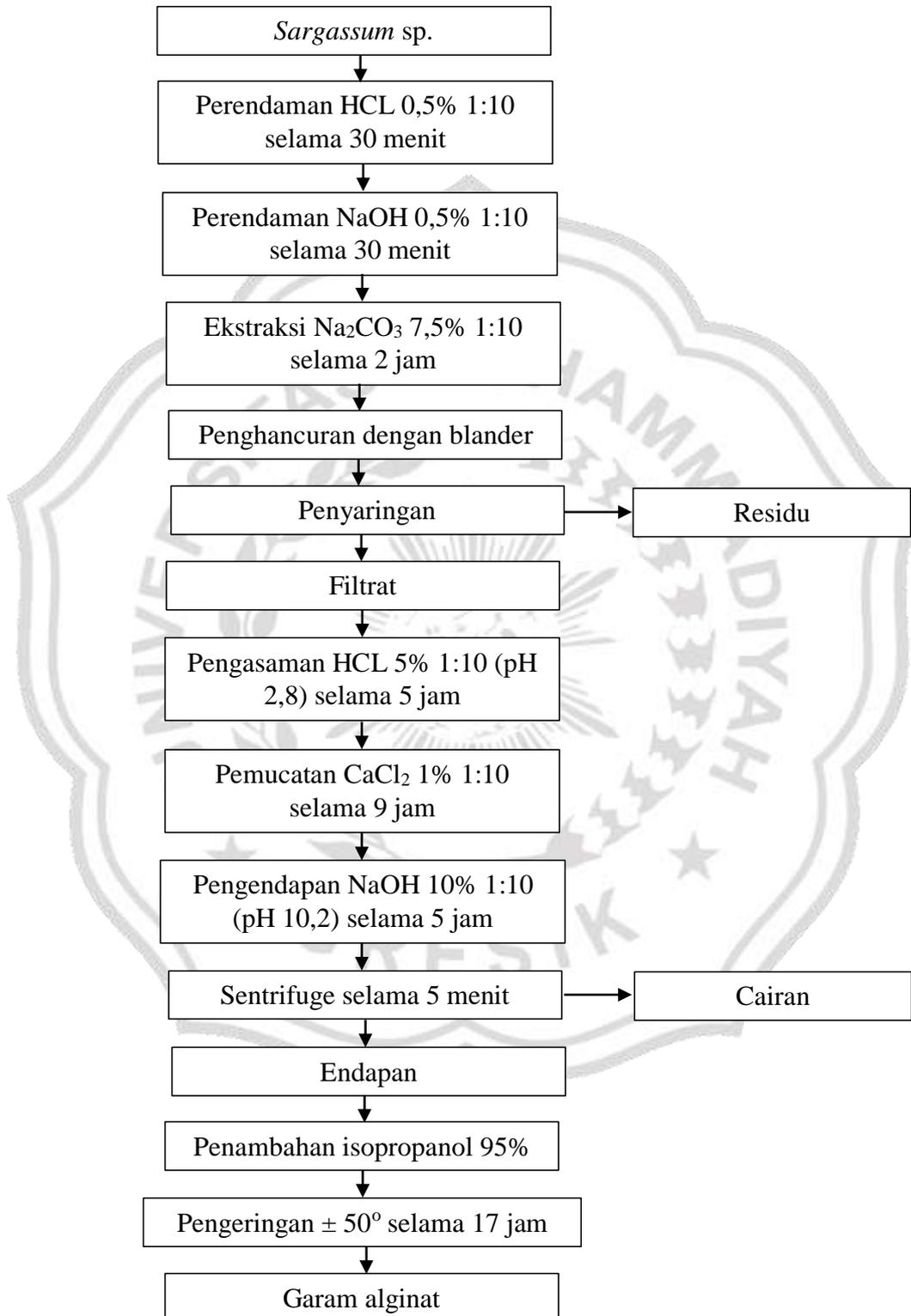


Gambar 7. Filter depurasi (a) filter perlakuan A (b) filter perlakuan B (c) gambar filter depurasi (d) alur filter depurasi

Keterangan :
 a. Ekstrak alginat
 b. pasir silika
 c. batu zeolit

3.3.4 Proses Pembuatan Alginat

Ekstraksi alginat dari rumput laut jenis *Sargassum* sp. yang digunakan dalam penelitian ini adalah menurut Zailanie *et al.*, (2012).



Gambar 8. prosedur pembuatan alginat

3.3.5 Perlakuan Penelitian Kerang Hijau

Bak depurasi yang digunakan dalam proses depurasi ini berkapasitas 600 liter air. Kerang hijau yang akan didepurasi dibak depurasi akan disusun rak kerang yang akan digunakan depurasi. Rak kerang hijau berbentuk persegi panjang yang terbuat dari kayu dengan ukuran 90 x 50 x 10 cm, rak kerang hijau berkapasitas 3 kg kerang hijau dengan size 5-8 yang akan di depurasi. Kerang hijau yang sudah tersusun di rak depurasi akan dimasukkan kebak depurasi dan disusun. Susunan rak depurasi pada bak depurasi berkapasitas 600 liter air muat 4 susun keranjang.

3.3.6 Pengambilan data

Pengambilan data penilitan diambil secara *stratified random sampling*, teknik ini yaitu proses mewakili masing-masing strata, misal atas, bawah ataupun tengah. Pengambilan sampel kerang hijau (*Perna viridis*) untuk uji kadar logam berat timbal (Pb), bahan organik dan total bakteri dilakukan pada saat sebelum proses depurasi dimulai dan setelah 16 jam proses depurasi kerang hijau. Hal ini dilakukan untuk membandingkan hasil penurunan kandungan pada kerang hijau sebelum dan sesudah dilakukannya proses depurasi dengan penambahan alginat pada filter.

Pengambilan sampel kerang hijau untuk uji logam berat timbal (Pb) dilakukan pada saat awal dan akhir proses depurasi baik dalam perlakuan A (Depurasi filter alginat) maupun perlakuan B (depurasi filter tanpa alginat/kontrol) hal ini dilakukan untuk mengetahui berapa prosentasi penurunan kadar logam berat timbal (Pb) setelah dilakuakn proses depurasi.

Uji kadar logam berat timbal (Pb) dilakukan dengan 2 perlakuan yaitu perlakuan A dan perlakuan B, kerang hijau yang diuji kadar logam berat timbal (Pb) sebanyak 20g daging daging diambil pada kerang secara acak untuk mewakili dari 4 rak depurasi. Perlakuan A pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {A (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {A (J16)} serta pada perlakuan B pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {B (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {B (J16)}.

Uji total bakteri pada kerang hijau dilakukan dengan 2 perlakuan yaitu perlakuan A dan perlakuan B, sampel yang digunakan untuk uji total bakteri yaitu daging kerang hijau. Kerang hijau yang diuji total bakteri setiap populasi pada rak depurasi diambil 8-10 buah kerang hijau (30g daging kerang hijau), hal ini

dilakukan dengan tujuan untuk pengulangan. Perlakuan A ulangan ke-1 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {A1 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {A1 (J16 I); A1 (J16 II); A1 (J16 III); A1 (J16 IV)}. Perlakuan B ulangan ke-1 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {B1 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {B1 (J16 I); B1 (J16 II); B1 (J16 III); B1 (J16 IV)}. Perlakuan A ulangan ke-2 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {A2 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {A2 (J16 I); A2 (J16 II); A2 (J16 III); A2 (J16 IV)}. Perlakuan B ulangan ke-1 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {B2 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {B2 (J16 I); B2 (J16 II); B2 (J16 III); B2 (J16 IV)}.

Bahan yang digunakan dalam uji total bahan organik pada proses depurasi kerang hijau yaitu air yang digunakan selama depurasi berlangsung. Uji total bahan organik pada air depurasi dilakukan dengan 2 perlakuan yaitu perlakuan A dan perlakuan B. Air yang diambil untuk dijadikan sampel uji bahan organik sebanyak 500 ml air depurasi. Perlakuan A pada ulangan ke-1 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {A1 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {A1 (J16)} serta pada perlakuan B pada ulangan ke-1 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {B1 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {B1 (J16)}. Perlakuan A pada ulangan ke-2 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {A2 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {A2 (J16)} serta pada perlakuan pada ulangan ke-2 pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0 {B2 (J0)} dan jam ke-16 proses depurasi {B2 (J16)}.

3.3.7 Uji Logam Berat Timbal (Pb) Pada Daging Kerang Hijau

Proses pengukuran logam berat timbal (Pb) dilakukan menggunakan metode AAS. Langkah pertama yang dilakukan dalam uji logam berat timbal yaitu menyalakan alat AAS. Keran gas asetilene dibuka untuk mengalirkan gas dalam proses pembakaran. Ekstrak sampel kerang hijau dialirkan menuju mesin AAS melalui selang penghubungnya. Sampel tersebut kemudian dibakar dengan menggunakan gas asetilene. Atom yang terserap kemudian dibaca oleh alat AAS tersebut. Nilai logam berat timbal (Pb) didapatkan melalui pensejajaran nilai absorbansi sampel dengan deret ukur 0-1 mg/g.

3.3.8 Uji Total Bakteri Pada Daging Kerang Hijau

Pengamatan jumlah total bakteri dilakukan dengan menggunakan metode Total Plate Count (TPC). Uji total bakteri menggunakan daging kerang hijau, daging yang digunakan dalam setiap sampel yaitu sebanyak 10g. Setiap 10g daging kerang hijau yang akan ditanam dan dihitung total bakteri dihancurkan dan dilarutkan dahulu dalam 90 ml air laut steril (larutan stok/induk). Larutan induk akan diencerkan ulang di tabung reaksi hingga diperoleh faktor pengenceran final 10^{-6} dan dikultur sebanyak 0.1 ml pada cawan petri steril yang telah berisi media Nutrient agar (28 g/L) dengan metode sebar (spread). Sampel tersebut kemudian diinkubasi dengan suhu 35°C selama 24 jam dan koloni bakteri yang tumbuh dalam media yang sudah dibuat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{TPC (CFU/g)} = \frac{\Sigma \text{ koloni} \times \text{pengenceran}}{\text{mL Larutan yang dikultur} \times \text{berat sampel}}$$

3.3.9 Uji Total Bahan Organik Pada Air Depurasi

Uji Total Bahan Organik dilakukan dengan prosedur pengujian berdasarkan SNI 06- 6989.22-2004. Berikut adalah langkah-langkah uji Total Bahan Organik:

1. 100 ml sampel uji dimasukkan ke Erlenmeyer volume 300 ml
2. Ditambahkan KMnO_4 0,01 N beberapa tetes ke dalam sampel uji hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda.
3. Menambahkan 5 ml asam sulfat 8 N bebas zat organik.
4. Selanjutnya dipanaskan menggunakan pemanas listrik pada suhu $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, bila terdapat bau H_2S , proses ini dilanjutkan dengan beberapa menit.
5. Ditambahkan 10 ml larutan baku KMnO_4 0,01 N.
6. Dipanaskan hingga mendidih selama 10 menit.
7. Selanjutnya tambahkan 10 ml larutan baku asam oksalat 0,01 N.
8. Titrasi dengan kalium permanganat 0,01 N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda.
9. Volume pemakaian KMnO_4 di catat sebagai perhitungan.
10. Apabila pemakaian larutan baku kalium permanganat 0,01 N lebih dari 7 ml, ulangi pengujian dengan cara mengencerkan sampel uji

Berikut adalah rumus untuk menghitung total bahan organik berdasarkan SNI 06-6989.22-2004, 2004:

$$\text{BOT (mg/L)} = \frac{[(10 - a) b - (10 \times c)] \times 1 \times 31,6 \times 1.000}{d} \times f$$

Keterangan : a = volume dari KMnO₄ 0,01 N yang dipakai
 b = normalitas KMnO₄ yang sebenarnya
 c = normalitas asam oksalat
 d = volume contoh atau sampel
 f = faktor pengenceran contoh uji

3.3.10 Kualitas Air

Pengukuran kualitas air pada proses depurasi kerang hijau (*Perna viridis*) merupakan variabel pendukung yang akan diamati selama penelitian. Pengukuran kualitas air antara lain adalah Suhu, pH, DO, dan Salinitas.

Table 3. Pengukuran kualitas air

No	Kualitas Air	Metode
1	Suhu (°C)	Menggunakan termometer dicelupan di air laut.
2	pH	Menggunakan pH meter
3	DO (ppm)	Menggunakan DO kit
4	Salinitas (ppt)	Pengukuran menggunakan refraktometer
5	Amonia (ppm)	Menggunakan ammonia tes kit

3.3.11 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdapat 3 variabel diantaranya yaitu variabel terikat, variabel bebas dan variabel pendukung. Variabel terikat (*dependent variable*) yaitu variabel respon atau *output*. Variabel bebas (*independent variable*) adalah variabel yang diduga sebagai sebab munculnya variabel variabel terikat (Winarno, 2013).

Variabel terikat dalam penelitian yaitu logam berat, dan total bakteri yang ada pada kerang hijau selama depurasi berlangsung serta kadar bahan organik di air. Variabel bebas dalam penelitian yaitu perlakuan penambahan ekstrak alginat dalam filter selama depurasi kerang hijau. Variabel Penelitian Pendukung yang akan

diamati dalam penelitian ini adalah kualitas air. Dalam pengukurannya antara lain adalah Suhu, pH, DO, Salinitas dan ammonia.

