

BAB III
METODE PENELITIAN



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Dusun Gopaan Sembunganyar, Dukun-Gresik, Rt/09 Rw/02 pada bulan Maret-April 2024. Pengambilan sampel *Daphnia* sp dilakukan setiap dua hari sekali. Analisis kadar protein, lemak, karbohidrat, dan ammonia berlangsung di Laboratorium Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Perangkat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Alat penelitian

NO.	ALAT	FUNGSI
1	9 wadah toples 16 liter	Untuk tempat hidup <i>Daphnia</i> sp
2	Alat Kualitas Air (pH, termometer, DO meter)	Sebagai alat pengukur kualita air selama proses penelitian
3	Kamera	Sebagai alat untuk mendokumentasikan hasil penelitian
4	Alat tulis	Sebagai alat untuk mencatat data berupa pulpen, spidol dan kertas
5	Saringan	Sebagai alat menyaring ampas larutan jahe
6	Parut	Sebagai alat menghaluskan jahe
7	Blender	Sebagai alat menghaluskan ampas tahu
8	Timbangan digital	Untuk mengukur berat jahe dan ampas tahu
9	Aerator	Perangkat yang digunakan untuk melakukan aerasi pada air
10	Selang aerator	Untuk mengalirkan udara dari aerator ke dalam air
11	Batu aerasi	Perangkat berpori yang digunakan untuk menyebarkan gelembung udara ke dalam air
12	Pipet ukur	Untuk mengambil larutan
14	Beaker glass	Sebagai penampung sampel/bahan sementara
15	Spektrofotometri	Untuk menentukan kadar amonia, dan karbohidrat

16	Ekstraksi gravimetri	Untuk menentukan konsentrasi suatu zat dalam sampel
17	Titrasi asam basa	Untuk menentukan kandungan protein

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari:

Tabel 2. Bahan Penelitian

NO.	BAHAN	FUNGSI
1	<i>Daphnia</i> sp	Sebagai objek penelitian
2	Cairan ampas tahu	Sebagai pakan <i>Daphnia</i> sp
3	Ekstrak jahe	Untuk pakan <i>Daphnia</i> sp
4	Kertas label	Sebagai penanda setiap sampel <i>Daphnia</i>
5	Tissue	Untuk membersihkan peralatan penelitian
6	Aquades	Untuk campuran pakan
7	Larutan fenol 99%	Untuk pembuatan larutan fenol
8	Natrium nitroprusida	Untuk pembuatan larutan natrium nitroprusida
9	Tritanium sitrat	Untuk pembuatan larutan alkalin sitrat
10	Natrium hidroksida	Untuk pembuatan larutan alkalin sitrat
11	Natrium Hipoklorit 5%	Untuk pembuatan larutan hipoklorit

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang diterapkan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang terdiri dari 3 perlakuan dan 3 kali pengulangan. Metode eksperimen merupakan suatu prosedur yang digunakan untuk mengetahui sebab akibat antar variabel (Sugiono, 2016). Penelitian ini menggunakan metode eksperimental akan digunakan untuk menganalisis pengaruh pemberian limbah ampas tahu dan ekstrak jahe terhadap pertumbuhan *Daphnia* sp.

P1U2	P2U1	P1U3
P3U3	P1U1	P3U1
P2U3	P3U2	P2U2

Gambar 6. Layout unit percobaan

Keterangan:

P1, P2, P3 = Perlakuan 1, 2, 3

U1, U2, U3 = Ulangan 1, 2, 3

Studi ini menerapkan desain eksperimen acak lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 3 ulangan. Proses penelitian meliputi:

1. P1 = 30 gram per liter ampas tahu ditambah 20 gram per liter ekstrak jahe
2. P2 = 35 gram per liter ampas tahu ditambah 15 gram per liter ekstrak jahe menghasilkan *Daphnia* dengan kandungan karbohidrat tinggi
3. P3 = 40 gram per liter ampas tahu ditambah 10 gram per liter ekstrak jahe menghasilkan *Daphnia* lemak tinggi

Daphnia sp diberi pakan 3 kali/hari dengan jam sebagai berikut: pagi pada pukul 08:00 WIB, siang sekitar pukul 12:00 WIB dan sore pukul 16:00 WIB, untuk setiap jam terapi pemberian pakan.

3.3.1 Penyediaan Ampas Tahu

Penyediaan ampas tahu dilakukan dengan meletakkan ampas tahu diatas loyang datar, diratakan, lalu dijemur dibawah cahaya matahari langsung selama dua hari. Setelah bubuk ampas tahu tampak mengering, diproses menggunakan blender dalam jumlah kecil untuk menghasilkan bubuk ampas tahu halus. Ampas tahu yang berupa serbuk siap digunakan sesuai dosis perlakuan.

3.3.2 Penyediaan Ekstrak Jahe

Jahe yang digunakan didapatkan dari pedagang pasar kecamatan Dukun. Jahe yang sudah dikumpulkan kemudian dibersihkan dan dikupas kulitnya menjadi ukuran kecil. Setelah itu ditimbang sebanyak 200 gram kemudian di parut. Parutan jahe dicampur aquades dengan perbandingan 1:2, lalu diperas dan disaring menggunakan kain tipis. Ekstrak jahe di simpan dalam suhu dingin (kulkas) sebagai larutan stok.

3.4 Langkah-Langkah Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Persiapan Media Kultur *Daphnia* sp

Sembilan toples budidaya *Daphnia* sp berukuran 16 liter yang dibersihkan dan didiamkan mengering dengan waktu 24 jam. Wadah kemudian ditempatkan secara acak dan tutup menggunakan kain. Media yang digunakan adalah air PDAM yang telah dibiarkan mengendap selama 24 jam di dalam wadah, dan setiap toples diisi dengan 8 liter air yang disaring menggunakan kain penapis.

3.4.2 Persiapan *Daphnia* sp

Daphnia sp yang dipakai dalam studi ini diperoleh dari penjual makanan untuk ikan. *Daphnia* sp diletakkan pada wadah tersendiri kemudian dilakukan penyaringan/pemilihan untuk memastikan *Daphnia* sp mendapat ukuran yang seragam. Selanjutnya, *Daphnia* sp dipindahkan ke dalam toples masing-masing perlakuan dan siap digunakan penelitian.

3.4.3 Penebaran *Daphnia* sp

Penyebaran *Daphnia* sp di dalam setiap toples berasal dari budidaya awal *Daphnia* sp. untuk memastikan ukuran yang sesuai yaitu menggunakan ukuran yang seragam range 2-3 mm dan di sortir sama rata pada wadah perlakuan. Kepadatan *Daphnia* sp adalah 20 individu per liter. kemudian diberikan pakan ampas tahu dan ekstrak jahe sesuai dengan perlakuan yang diterapkan, dan pengamatan dilakukan berdasarkan parameter yang telah ditetapkan dalam studi ini.

3.4.4 Pemberian Pakan Harian

Setiap hari, pakan di berikan sesuai dosis perlakuan dibagi menjadi 3 kali pemberian, yakni pada pada jam 08.00 WIB di pagi hari, sekitar jam 12.00 WIB di siang hari, dan jam 16.00 WIB di sore hari untuk setiap perlakuan (Islama *et al.*, 2020).

3.4.5 Pergantian Air

Untuk menjaga kualitas air yang optimal selama budidaya, ventilasi konstan dan penggantian air harus dilakukan. Penggantian air pada kultur *Daphnia* sp dapat dilakukan dengan metode siphon, yaitu air yang berasal dari tangki kultur dikeluarkan dengan menggunakan selang dan pipet. Frekuensi penggantian air disesuaikan dengan kebutuhan *Daphnia* sp di lingkungan budidaya (Maria Stralka, 2016).

3.5 Metode Pengumpulan Data

Beberapa teknik untuk mengumpulkan data dalam penelitian ini meliputi:

1. Peneliti Lapangan (*field riset*)

Peneliti mengumpulkan informasi dengan cara mengamati langsung subjek penelitian.

2. Kepustakaan (peneliti perpustakaan)

Peneliti mengumpulkan materi dari majalah, dokumen dan publikasi lain yang relevan sebagai sumber informasi untuk penelitian ini.

3.5.1 Data Primer

Data primer adalah data yang dikumpulkan secara langsung oleh peneliti melalui observasi dan eksperimen.

a. Observasi

Teknik observasi dapat berfungsi sebagai sumber data primer atau sekunder tergantung pada kaitannya dengan perumusan masalah penelitian. Apabila pertanyaan penelitian dapat dijawab melalui pengamatan langsung, maka metode observasi digunakan sebagai sumber data primer. Hasil dari pengamatan bisa berupa teks, gambar, foto, video, rekaman audio, dan lain sebagainya. Jenis-jenis data ini umumnya digunakan sebagai data utama dalam penelitian kualitatif.

b. Eksperimen

Eksperimen adalah metode pengumpulan data primer yang melibatkan peneliti dalam menciptakan situasi atau kondisi tertentu untuk melihat bagaimana variabel tertentu mempengaruhi hasil atau respon yang diamati.

3.5.2 Data Sekunder

Sugiyono (2018) menyatakan bahwa data sekunder merupakan informasi yang dikumpulkan oleh peneliti atau pengumpul data bersama dengan dokumen-dokumen yang relevan dengan tujuan penelitian. Jenis data sekunder meliputi data internal dan eksternal. Data internal mencakup dokumen-dokumen akuntansi dan operasional yang dikumpulkan, dicatat, dan disimpan di dalam suatu organisasi. Sementara itu, data eksternal adalah informasi yang biasanya dikumpulkan oleh entitas di luar organisasi yang sedang diteliti. Data sekunder ini dapat diperoleh dari laporan, literatur, publikasi tambahan, dan data yang disediakan oleh lembaga penelitian.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Kepadatan Populasi *Daphnia* sp

Kepadatan jumlah individu *Daphnia* sp dinilai masing-masing dua hari sekali tergantung durasi pengambilan sampel (Astika et al., (2015). Pengamatan dilakukan pada pukul 09.00 hingga 11.00 hingga hari terakhir. Perhitungan kepadatan populasi *Daphnia* sp ditentukan dengan mengumpulkan 40 ml sampel. sampel pada setiap perlakuan yang sebelumnya telah dihomogenisasi dalam media kultur, sampel kemudian dituangkan ke dalam cawan petri serta ditentukan jumlah individu *Daphnia* yang dihitung sp. Perhitungan dijalankan tiga kali dan hasilnya diambil rata-ratanya. Rata-rata jumlah individu *Daphnia* sp diubah menjadi individu per liter (ind.L⁻¹) dengan menggunakan rumus yang sesuai (Suprimantoro et al., 2016) sebagai berikut:

$$a = b \times \left(\frac{p}{q}\right)$$

Keterangan:

- a = Jumlah individu *Daphnia sp* dalam budidaya (ind.L⁻¹)
- b = Jumlah rerata individu *Daphnia sp* yang dihitung pengulangan (Ind)
- p = Jumlah cairan dalam budidaya (satuan volume cairan)
- q = Volume sampel media kultur (liter)

3.6.2 Laju Pertumbuhan *Daphnia sp*

Menurut Suci *et al.*, (2016), laju pertumbuhan *Daphnia sp* dihitung dari hari pertama hingga mencapai puncak dengan menggunakan rumus berikut:

$$g = \frac{\ln(Nt) - \ln(No)}{t} \times 100\%$$

Keterangan:

- g = Laju pertumbuhan populasi dalam persen per hari (%.day¹)
- No = Jumlah individu pada awal penelitian, dalam satuan individu per liter (ind.L⁻¹)
- Nt = Jumlah individu pada akhir penelitian, dalam satuan individu per liter (ind.L⁻¹)
- t = Masa pemeliharaan penelitian dalam hari (hari)

3.6.3 Analisis proksimat *Daphnia sp*

Analisis proksimat bermanfaat untuk mengevaluasi mutu pakan atau bahan pangan, secara khusus untuk menilai kandungan standar nutrisi yang seharusnya terdapat dalam konteks tersebut. Saat penelitian berakhir akan dilakukan analisis proksimat pada *Daphnia sp* untuk menentukan kadar nutrisinya. Metode proksimat akan mengikuti prosedur yang sesuai dengan AOAC 2019. Analisis kualitas nutrisi atau uji proksimat dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

3.6.4 Fisika Kimia Air

Variabel fisik cairan yang diukur dalam penelitian ini meliputi Potensi hydrogen (pH), suhu, DO (Oksigen terlarut), dan ammonia, yang diukur setiap dua hari sekali (Nasir dan Khalil, 2016). Pengukuran pH dengan pH meter, suhu dengan

termometer, dan DO dengan DO meter dan kadar amonia (NH_3) menggunakan spektroskopi UV-Visible adalah salah satu cara sederhana untuk menentukan unsur-unsur pada kadar kualitas dan kuantitatif rendah. Metode ini juga sangat sensitif dan cocok untuk analisis amonia. Langkah-langkah untuk menentukan kadar amonia adalah sebagai berikut:

1. Teknik pengambilan sampel

Alat pengambilan sampel disiapkan berdasarkan hasil survei, alat-alat kemudian di cuci dengan menggunakan air untuk diambil sampelnya. Sampel dikumpulkan sesuai dengan persyaratan analitis, kemudian ditempatkan masuk ke dalam wadah yang sudah disiapkan sebelumnya dan diberi label. Setelah langkah tersebut, pengujian langsung dilakukan.

2. Pengambilan contoh uji

Sampel air sejumlah 2,5 liter ditempatkan dalam wadah 2,5 L

3. Pembuatan larutan standar amonia 100 mg/L

10 mililiter larutan standar amonia 1000 miligram per liter diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dalam labu gelas 100 mililiter. sesudah itu diencerkan dengan aquades hingga mencapai garis batas, kemudian dihomogenisasi.

4. Siapkan larutan standar 10 miligram per liter

Sepuluh mililiter larutan standar amonia 100 mg/L dipompa ke dalam labu takar 100 ml dan diencerkan dengan air suling hingga mencapai garis batas.

5. Siapkan larutan standar 1 miligram per liter

10 mililiter larutan standar amonia 10 miligram per liter ke dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan air suling hingga homogen hingga mencapai garis batas.

6. Pembuatan larutan fenol

Sejumlah 10 mililiter larutan standar amonia 10 miligram per liter diteteskan ke dalam labu takar 100 mL dan diukur menggunakan air suling sampai homogen hingga garis batas.

7. Siapkan Larutan Natrium Nitroprusida 0,5%

Natrium nitroprusida sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam air suling kemudian pindahkan ke dalam labu takar 100 mL, lalu ukur sampai mencapai garis batas, aduk hingga rata.

8. Buatlah larutan basa dari sitrat

Trinatrium sitrat sebanyak 200 gram dan 50 gram natrium hidroksida dilarutkan dalam air suling. Larutan ini dituangkan ke dalam labu takar 1000 mL kemudian diukur sampai mencapai garis batas, diaduk hingga homogen.

9. Siapkan laturan natrium hipoklorit 5 persen

41,6 mL natrium hipoklorit ditransfer ke dalam labu takar 100 mililiter. Larutan kemudian diencerkan dengan air murni sampai mencapai tanda labu dan diaduk sampai homogen.

10. Buatlah larutan pengoksidasi dengan perbandingan 4 banding 1

Larutan alkali sitrat sebanyak 100 mililiter dan natrium hipoklorit 25 mililiter dicampur secara homogen ke dalam gelas kimia.

11. Membuat rangkaian kalibrasi

Rangkaian larutan standar 25 mililiter dengan kadar berbeda (0,00; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,09; 1,00; 1,10; dan 1,20 mg/L) disuntikkan ke dalam 25 mL sampel sel. Kemudian tambahkan larutan fenol 1 mililiter, 1 ml larutan natrium nitropuside serta larutan pengoksidasi 2,5 mililiter. Campuran dihomogenisasi kemudian dibiarkan selama 1 jam. Kemudian konsentrasi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 640 nm.

12. Buat spike

Sampel uji 24,5 mililiter disuntikkan ke dalam sel sampel, lalu tambahkan larutan standar 1,25 mililiter amonia 0,5 miligram per liter. Campuran ini kemudian diaduk hingga homogen.

13. Pengecekan konsentrasi amonia

Sampel uji 25 mililiter dipindahkan ke dalam kuvet sampel 50 mililiter. Kemudian tambahkan larutan fenol 1 mililiter, 1 ml larutan natrium nitropuside serta larutan pengoksidasi 2,5 mililiter. Campuran dihomogenisasi kemudian dibiarkan selama satu jam. Kemudian, serapan larutan diukur secara spektrofotometri pada 640 nm.

14. Uji konsentrasi lonjakan

Larutan lonjakan diolah dengan menambahkan larutan fenol 1 mililiter, larutan natrium nitropuside 1 mililiter, serta 2,5 mililiter larutan oksidan. Campuran

kemudian dihomogenisasi dan dibiarkan selama satu jam. Kemudian, serapan larutan diambil pengukurannya secara spektrofotometri pada 640 nm.

15. Penentuan batas deteksi instrumen (IDL)

25 ml akuades dipipet sebanyak tujuh kali dan dimasukkan ke dalam kuvet sampel berukuran 50 mililiter. Setelah itu ditambahkan, larutan fenol 1 mililiter, larutan natrium nitroprusida 1 serta dan 2,5 ml larutan pengoksidasi ditambahkan ke dalam campuran. Campuran dihomogenisasi dan dibiarkan selama 1 jam. Kemudian, serapan campuran diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 640 nanometer.

16. Penentuan batas deteksi metode (MDL)

0,4 ml larutan spike dipipet sebanyak tujuh kali, setelah itu diencerkan dengan sampel uji sampai mencapai garis batas hingga homogenitas. Kemudian tambahkan larutan fenol 1 mililiter, larutan natrium nitroprusida 1 mililiter serta 2,5 ml larutan oksidan. Campuran dihomogenisasi kemudian dibiarkan selama satu jam. Kemudian, serapan campuran diukur secara spektrofotometri pada 640 nm.

17. Penentuan yang akurat

25 ml larutan Bahan Referensi Bersertifikat (CRM) dipipet sebanyak 7 kali ke dalam kuvet sampel berukuran 50 ml. Kemudian tambahkan larutan fenol 1 mililiter, natrium nitroprusida 1 mililiter, dan 2,5 mililiter larutan oksidan. Campuran dihomogenisasi dan dibiarkan selama 1 jam. Kemudian, serapan campuran diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 640 nanometer.

18. Pengukuran Ketetapan

25 mL cairan Bahan Referensi Bersertifikat dipipet sebanyak 7 kali ke dalam kuvet sampel berukuran 50 mL. Kemudian, larutan fenol 1 mililiter, larutan natrium nitroprusida 1 serta serta larutan oksidan 2,5 mililiter ditambahkan ke dalam campuran. Campuran kemudian diaduk hingga merata dan dibiarkan selama 1 jam. Absorbansi campuran diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 640 nanometer.

19. Menentukan perkiraan ketidakpastian

Perkiraan ketidakpastian dapat dilakukan menggunakan langkah-langkah berikut: pertama, menentukan rumus induk yang relevan; Selanjutnya, buatlah

diagram sebab-akibat untuk mengidentifikasi bahan-bahan yang mempengaruhi formula utama. Kemudian, hitung nilai ketidakpastian masing-masing komponen lalu gabungkan masing-masing ketidakpastian tersebut sehingga diperoleh nilai ketidakpastian total. Terakhir, perluas ketidakpastian dengan menghitung interval kepercayaan 95% ($k=2$).

3.7 Analisis Data

Informasi yang diperoleh adalah kepadatan populasi puncak pertama dari *Daphnia* sp dapat diungkapkan sebagai titik tertinggi jumlah individu *Daphnia* sp dalam suatu periode waktu yang ditampilkan dalam bentuk grafik pertumbuhan populasi, puncak pertama kepadatan populasi *Daphnia* sp dapat terlihat sebagai titik tertinggi pada kurva pertumbuhan jumlah individu *Daphnia* sp dalam rentang waktu tertentu. Analisis dilakukan menerapkan analisis *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95 persen (Islama dkk., 2014). Jika nilai signifikansi adalah 0,05, maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan memiliki pengaruh signifikan, sehingga dilakukan pengujian tambahan dengan menerapkan metode untuk menentukan Perbedaan Nyata Terkecil. Data yang dianalisis meliputi kepadatan populasi dan laju pertumbuhan. Perangkat lunak yang digunakan untuk analisis statistic data adalah Excel 2007 dari Microsoft Office. Metode uji Anova sebelum dan setelah perlakuan serta kualitas air dianalisis dengan cara yang bersifat deskriptif.