

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April sampai Mei 2016 di Hatchery pembenihan udang milik bapak Fansuri Jenu, Tuban.

#### **3.2 Materi Penelitian**

##### **3.2.1 Bahan penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari hewan coba berupa *Daphnia* sp. yang diperoleh melalui kultur *Daphnia* sp., air PDAM yang diendapkan selama 24 jam, timbal acetat  $Pb(CH_3COO)_2$ , akuades sebagai pelarut  $Pb(CH_3COO)_2$  dan dedak padi sebagai pakan *Daphnia* sp. selama kultur berlangsung.

##### **3.2.2 Alat penelitian**

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Timbangan, aerator, selang, *object glass*, *cover glass*, wadah perlakuan, mikroskop, pipet, bak plastik, saringan, termometer, amoniak *test kit*, DO meter, dan pH *pen*.

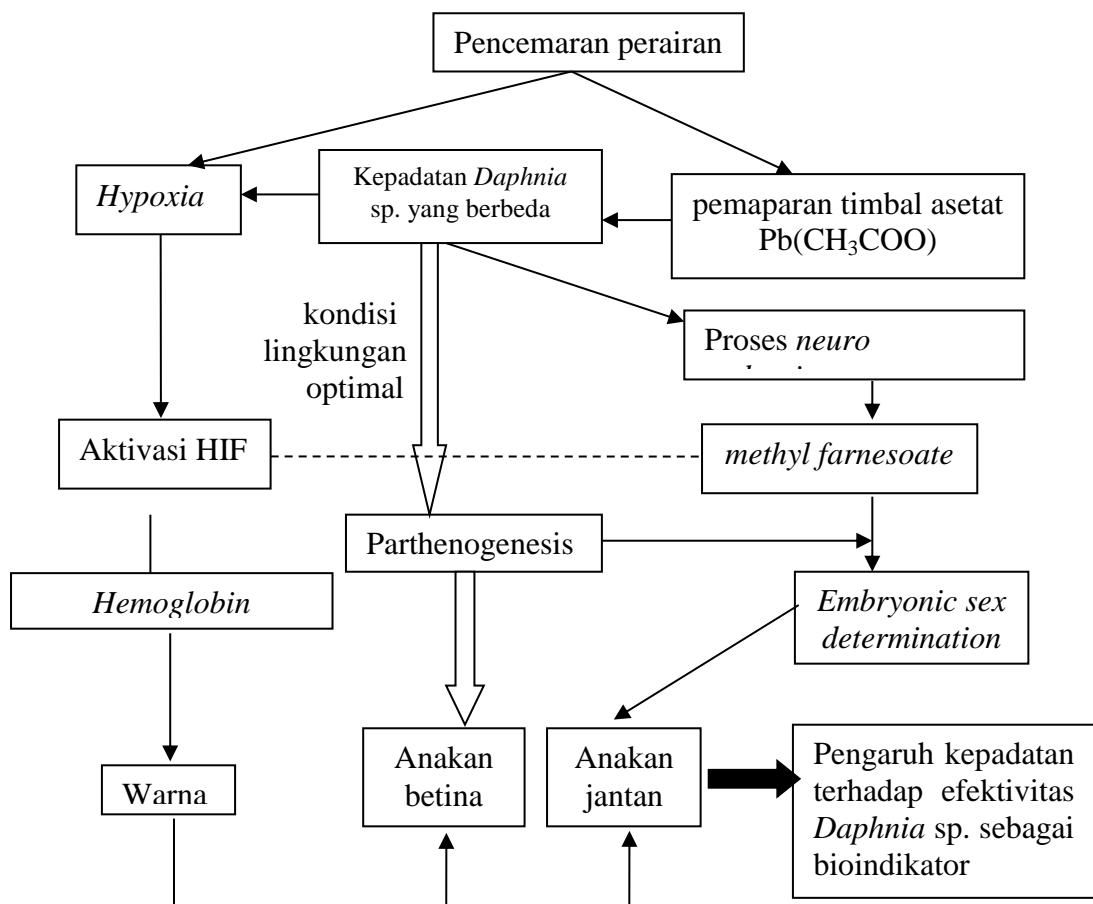
#### **3.3. Kerangka Konseptual Penelitian**

Air memiliki peran penting dalam kehidupan organisme akuatik, manusia dan hewan. Perkembangan pesat industri dan peradaban berdampak negatif terhadap baku mutu kualitas air. Hasil penelitian di perairan Indonesia menunjukkan peningkatan kandungan logam berat toksik utama seperti *mercury* (Hg), timbal (Pb), *zinc* (Zn), *cadmium* (Cd) dan *copper* (Cu) di beberapa perairan Indonesia hingga melebihi ambang batas yang ditentukan (Mustaruddin dkk., 2005).

Pencemaran dapat membuat oksigen perairan menurun sampai pada kondisi hypoxia ataupun anaerob, sehingga akan menyebabkan hypoxia (Schramm, 1997).7). Dekken (2005) menyatakan bahwa ketika *Daphnia* sp. berada pada kondisi hypoxia (konsentrasi oksigen terlarut yang rendah), maka akan terjadi peningkatan produksi hemoglobin yang akan menyebabkan bagian luar

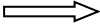
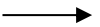

karapaks yang awalnya berwarna pucat menjadi berwarna merah akibat aktivasi proses *neuro endocrin* yang dapat memicu produksi *methyl farnesoate*, yaitu hormon utama crustacea yang disintesis oleh organ mandibular crustacea (Rider *et al.*, 2004). *Methyl farnesoate* dapat mempengaruhi induk *Daphnia* sp. yang telah dewasa kelamin untuk menghasilkan anakan jantan dengan merangsang oosit sehingga berkembang menjadi individu jantan dan akumulasi hemoglobin merubah warna *Daphnia* sp. menjadi kemerahan (Olmstead and LeBlanc, 2002).

Ayu (2009) menyatakan kepadatan *Daphnia* sp. yang berbeda memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap konsentrasi oksigen terlarut dan berkorelasi negatif dengan skor warna *Daphnia* sp. Kondisi populasi *Daphnia* sp. perairan yang beragam (aerob- anaerob) menyebabkan respon Pb yang berbeda terhadap *Daphnia* sp. Panna (2009) menyatakan bahwa logam berat Pb pada kondisi aerob mempengaruhi perubahan anakan jantan tetapi tidak mempengaruhi skoring warna. Dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui pengaruh kepadatan terhadap efektifitas *Daphnia* sp. sebagai *bioindikator* pencemaran Pb(CH<sub>3</sub>COO) pada perairan. Bagan kerangka konseptual penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5.



### Gambar 5. Bagan kerangka konseptual penelitian

Keterangan gambar :

-  : Alur sistem reproduksi aseksual pada *Daphnia* sp. yang terjadi pada kondisi perairan yang optimal untuk mendukung kehidupan *Daphnia* sp..
-  : Alur perubahan sistem hormonal pada *Daphnia* sp. akibat pencemaran logam berat Pb pada perairan.
-  : Alur pemanfaatan *Daphnia* sp. sebagai indikator pencemaran Pb pada perairan dengan memanfaatkan perubahan warna tubuh dan produksi anakan jantan *Daphnia* sp.
- HIF : *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) merupakan aktivator transkripsi yang memberikan respon terhadap hypoxia melalui pengikatan *hypoxia respons element* (HRE) yang terletak pada promotor region dari region gene hemoglobin.

### 3.4 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental (Silalahi, 2003). Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial, karena terdapat dua faktor berbeda (Kusriningrum, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan sebab akibat dengan cara memberikan timbal acetat  $Pb(CH_3COO)$  pada kepadatan populasi *Daphnia* sp. yang berbeda terhadap perubahan warna dan persentase anakan jantan. Sedangkan dua faktor yang berbeda yaitu kepadatan populasi *Daphnia* sp. dan konsentrasi  $Pb(CH_3COO)$  pada media perlakuan. Berikut merupakan rumus statistika Rancangan Acak Lengkap Faktorial :

$$Y_{ijk} : \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan :

- $Y_{ijk}$  = hasil pengamatan untuk faktor A taraf ke-i, faktor B taraf ke -j dan pada ulangan ke-k,
- $\mu$  = nilai tengah umum
- $\alpha_i$  = pengaruh faktor A pada taraf ke-i
- $\beta_j$  = pengaruh faktor B pada taraf ke-j
- $(\alpha\beta)_{ij}$  = pengaruh interaksi AB pada taraf ke-i (dari faktor A), dan taraf ke-j (dari faktor B).
- $\epsilon_{ijk}$  = pengaruh acak (galat percobaan) pada taraf ke-i (faktor A), taraf ke-j (faktor B), interaksi AB yang ke-i dan ke-j, pada ulangan ke-k.

### 3.4.1 Prosedur penelitian

#### A. Persiapan penelitian

Persiapan yang dilakukan sebelum penelitian adalah persiapan peralatan. Peralatan yang akan digunakan dicuci bersih dan dibilas dengan air tawar. Peralatan yang sudah bersih dikeringkan selama 24 jam.

#### B. Produksi anakan *Daphnia* sp.

Proses produksi anakan *Daphnia* sp. dilakukan dengan melakukan kultur melalui teknik *daily feeding* menggunakan rendamandedak padi. Pada hari ke-3 dilakukan pemanenan anakan *Daphnia* sp. dan dipisahkan hingga siap digunakan untuk percobaan.

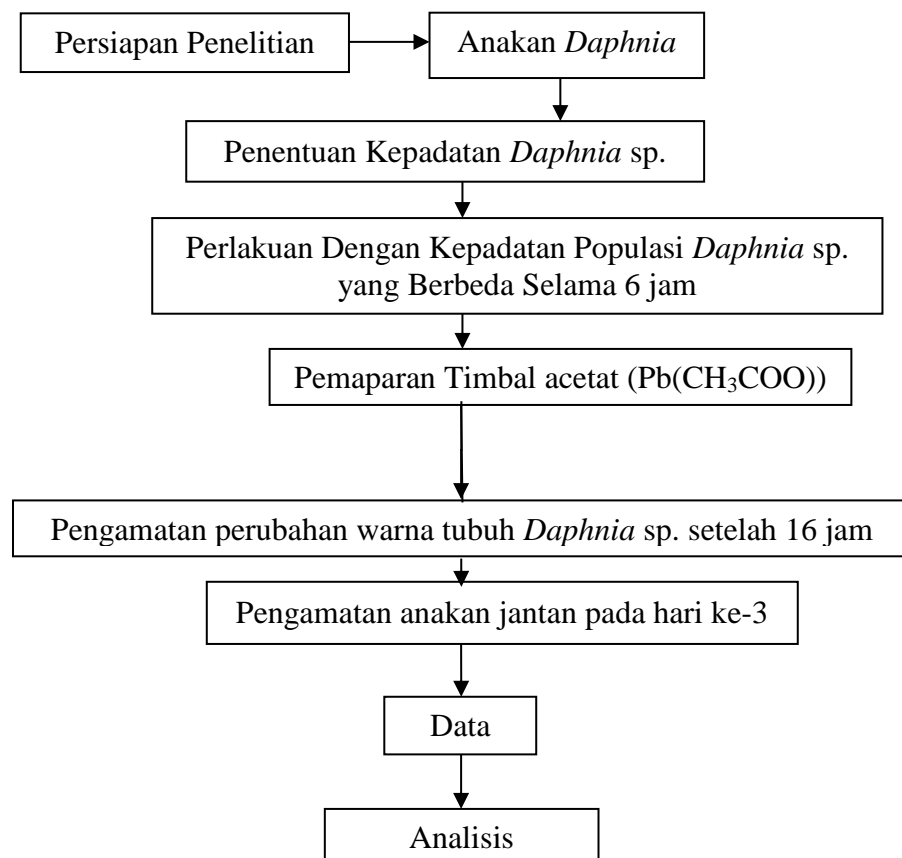
#### C. Penentuan Konsentrasi LC<sub>50</sub> Pb terhadap kepadatan anakan *Daphnia* sp. yang berbeda

Anakan *Daphnia* sp. diberi 3 perlakuan dengan konsentrasi Pb(CH<sub>3</sub>COO) yang berbeda pada setiap perlakuan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Setiap perlakuan dan ulangan dilakukan terhadap 50 ekor, 200 ekor dan 400ekor anakan *Daphnia* sp.. *Daphnia* sp. dengan kepadatan yang berbeda tersebut dipelihara dalam wadah tertutup dengan lubang kecil pada tutupnya. Selanjutnya, dilakukan pengukuran konsentrasi oksigen terlarut pada jam ke-6 untuk mengkondisikan oksigen terlarut pada *Daphnia* sp.. Kemudian pemaparan Pb(CH<sub>3</sub>COO) dilakukan pada setiap perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi Pb yang digunakan diambil berdasarkan data penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa LC<sub>50</sub> 48 jam dari Pb terhadap *Daphnia* sp. adalah 3,166 mg/l (Chang, 2005). Konsentrasi Pb(CH<sub>3</sub>COO) yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 1,05 mg/l, 2,1 mg/l, dan 3,16 mg/l. Selanjutnya, pengamatan skor warna *Daphnia* sp. dilakukan setelah 16 jam, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kondisi tersebut mempengaruhi konsentrasi oksigen terlarut yang relatif stabil dan terjadi perubahan warna *Daphnia* sp. (Ayu, 2009). Pada penelitian ini dilakukan pengamatan anakan jantan *Daphnia* sp.

dilakukan pada hari ke-3 sebab daur hidup *Daphnia* sp. dari anakan hingga dewasa kelamin memerlukan waktu 3-4 hari (Clare, 2002).

### 3.4.2 Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan Faktorial Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan memberikan 4 perlakuan kepadatan populasi *Daphnia* sp. (faktor A) dan 4 perlakuan konsentrasi  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})$  (faktor B) dengan 3 ulangan. Berikut merupakan diagram alir penelitian :



**Gambar 6.** Diagram alir penelitian

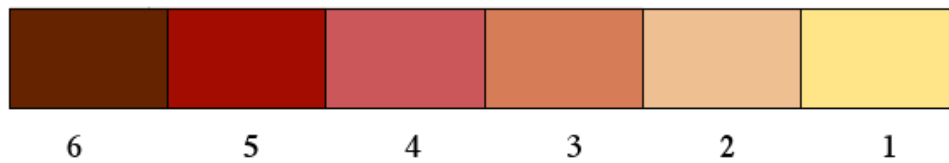
### 3.4.3 Parameter penelitian

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah perubahan warna dan anakan jantan *Daphnia* sp.. Parameter penunjang berupa pengamatan kualitas air (suhu, pH, amoniak dan oksigen terlarut).

#### A. Parameter Utama

##### a. Pengamatan Perubahan Warna

Perubahan warna diamati setelah waktu 16 jam dengan metode skoring warna menggunakan indikator pada kertas pH yang dianalogikan dengan metode skoring warna menurut Deken (2005) (Gambar 7). Setiap ulangan diambil beberapa sampel acak, kemudian dilakukan skoring sesuai perubahan yang terjadi melalui pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x dan jumlah dari skor individu yang terambil tersebut dihitung rata – rata untuk mengetahui skor rata - rata.



**Gambar 7.** Skoring perubahan warna *Daphnia* sp. (Deken, 2005)

b. Pengamatan Persentase Anakan Jantan

Pengamatan jumlah anakan jantan dilakukan pada hari ke-3 dengan mengamati seluruh anakan *Daphnia* sp. yang dihasilkan pada setiap perlakuan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x. Selanjutnya dilakukan penghitungan persentase anakan jantan. Jenis kelamin *Daphnia* sp. ditentukan berdasarkan ciri morfologi yaitu ukuran tubuh dan antena pertama (Ebert, 2005). *Daphnia* sp. jantan umumnya lebih kecil dibanding betina, tetapi memiliki antena pertama yang lebih panjang dengan satu lekukan. Sedangkan *Daphnia* sp. betina memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dibandingkan jantan tetapi dengan antenna pertama yang lebih pendek dan tanpa lekukan. Panjang antenna I *Daphnia* sp. jantan yaitu 0,13 - 0,21mm, sedangkan pada betina memiliki antenna I 0,05-0,075mm (Clare, 2002). Perbedaan antenna antara *Daphnia* sp. jantan dan betina dapat dilihat pada gambar 8.



**Gambar 8.** *Daphnia* sp. Jantan dan Betina (Panna, 2009)

## B. Parameter Pendukung

### a. Pengukuran Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) *pen* dimasukkan ke dalam air sampai *probe* menyentuh air sekitar 1 cm. Selanjutnya, tombol *on* ditekan dan dibiarkan sejenak sampai nilai pH yang tertera tidak berubah dan hasilnya dicatat.

### b. Pengukuran Kadar Amoniak

Prosedur pengukuran kadar amoniak menggunakan amoniak *test kit* yaitu dengan mengambil sampel air yang akan diukur sebanyak 5 ml ke dalam gelas pengukur dan ditambahkan 6 tetes reagen 1, selanjutnya dilakukan pengocokan. Selanjutnya, ditambahkan reagen 2 dan 3 dengan cara yang sama dengan reagen 1. Setelah itu, dibiarkan selama 5 menit sampel akan berubah warna. Warna air sampel dicocokkan dengan indikator warna pada prosedur penggunaan agar dapat diketahui kadar amoniak pada sampel air.

### c. Pengukuran Suhu Air

Termometer air dimasukkan ke dalam air dan dibiarkan kurang lebih satu menit. Selanjutnya, dilakukan pencatatan hasil yang tertera pada *thermometer* tersebut.

## 3.5 Analisis Data

Data penelitian perubahan warna *Daphnia* sp. dianalisis secara statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* (Schlefer, 2006), sedangkan data hasil pengamatan anakan jantan *Daphnia* sp. akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan ANOVA (*Analisis of Variance*). Apabila pada data yang dihasilkan terdapat perbedaan maka akan dilakukan uji lanjutan. Uji lanjutan yang digunakan adalah Uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan' Multiple Range Test*) (Kusriningrum, 2008).