

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dan pengukuran kualitas air dilakukan pada bulan Oktober sampai November 2017 di. Sedangkan untuk kultivasi dilaksanakan di laboratorium Mandiri KaVe Dalegan

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian kali ini yakni alat-alat gelas yang pada umumnya digunakan pada laboratorium, set lampu neon philips 40 watt, toples yang terbuat dari bahan gelas, panci, selang, batu aerator, aerator, refraktometer, haemositometer, pompa vakum, *funnel glass*, *centrifuge*, *ultrasonic*, mikroskop Olympus CX 21, dan Spektrofotometer Thermo scientific Genesys 20, DO meter, pH meter, pipet serologi.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian kali ini yakni biakan murni *Chlorella* sp. yang diperoleh dari Balai Besar Budidaya Air Payau Situbondo, logam berat Pb, air laut, aquades, klorin, deterjen, alkohol 97% teknis, aluminium foil dan media Walne (1 mL/1000 mL) sebagai pupuk untuk kultur plankton, reagent analisa PO₄, dan reagent analisa klorofil A.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Dalam penelitian ini analisis terhadap data akan dilakukan dengan dua metode, yaitu analisis statistik dan analisis pustaka. Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian logam berat Pb pada kultur mikroalga *Chlorella* sp. dan interaksinya terhadap paramater yang diukur. Analisis pustaka dilakukan untuk menjelaskan hasil penelitian berdasarkan analisis statistik dan tinjauan ilmiah lainnya. Analisis statistik yang dilakukan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan tiga kali ulangan. Adapun rumus yang digunakan dalam RAL (Rancangan Acak Lengkap) adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \sigma_i + \xi_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} : Data respon yang diamati pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : Nilai tengah

σ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Galat percobaan pada perlakuan ke-i dan ke-j

Perlakuan yang diberikan adalah pemberian logam berat Pb pada kultur *Chlorella* sp. dengan 3 kali ukangan. Perlakuan yang diberikan sebagai berikut :

A : Pb dengan konsentrasi 5 ppm

C : Pb dengan konsentrasi 10 ppm

B : Pb dengan konsentrasi 15 ppm

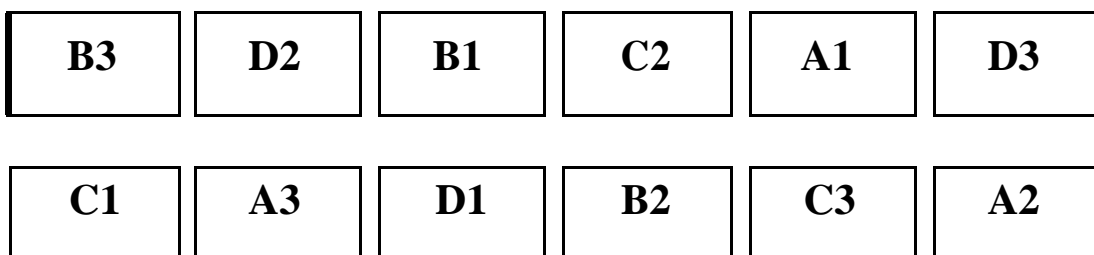
D : Pb dengan konsentrasi 0.0 ppm sebagai control

Data penelitian diolah menggunakan SPSS dengan menganalisis kepadatan *Chlorella* menggunakan analisis ovariance / ANOVA. Jika berpengaruh signifikan dilanjut dengan uji Tukey kengan kepercayaan $P < 0.005$. Untuk melihat hubungan antarakonsentrasi Pb dan kepadatan populasi *Chlorella* dengan menggunakan analisis regresi linier. Sedangkan data kualitas air yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

Penentuan konsentrasi Pb didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Purnamawati *et.,al* (2015) Strain dari species ini merupakan strain yang sangat toleran dengan bahan pencemar bahkan dengan konsentrasi bahan pencemar yang tinggi. Usia kultur memang cukup lama 76 hari, namun ternyata *C. vulgaris* masih mampu tumbuh dan menyerap ion logam Pb hingga 5 ppm dengan kondisi nutrisi yang minim. Hala *et.,al* (2013) mengemukakan, peningkatan cemaran logam berat pada perairan akan berbanding lurus dengan adanya modernisasi tanpa ada penanganan limbah yang baik.

3.3.2 Layout Penelitian

Penempatan media kultivasi akan dilakukan secara acak seperti pada gambar 4 dibawah ini :



Gambar 4. Layout penelitian

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

Merujuk penelitian Prabowo (2009) Persiapan penelitian dilakukan agar seluruh alat, bahan, dan kondisi lingkungan kultur dapat mendukung setiap tahap penelitian dengan optimal. Persiapan penelitian ini terdiri atas beberapa tahap, yaitu: sterilisasi alat dan media kultur, penyiapan air laut, penyiapan bibit, penyiapan pupuk, serta penyusunan peralatan kultur. Tahapan persiapan penelitian yang dilakukan antara lain sterilisasi alat dan media kultur, penyiapan air laut sebagai media kultur, pembuatan larutan stok timbal dan penyiapan bibit *Chlorella* sp.

Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan atau meminimalkan keberadaan mikroorganisme atau zat pengganggu pada alat dan media kultur yang akan digunakan selama penelitian. Tahapan sterilisasi yang dilakukan merujuk pada Isnansetyo dan Kurniastuty (1995) serta Zahara (2003) sebagai berikut:

- 1) Semua peralatan non elektronik dicuci dengan menggunakan sabun pencuci perabotan gelas, kemudian dibilas dengan air dingin yang telah dimasak pada suhu 100°C sebelumnya. Selanjutnya peralatan tersebut dibilas dengan larutan HCl 4 N yang telah diencerkan menjadi 10% kemudian dibilas kembali dengan air dingin hasil rebusan. Pembilasan selanjutnya adalah menggunakan alkohol 70% dan terakhir dibilas dengan akuades hingga bau alkohol hilang. Pengeringan peralatan setelah pencucian dilakukan dengan meniriskannya di atas meja yang telah disemprot alkohol sebelumnya.
- 2) Selang plastik aerator, gelas kultur, dan pengatur debit udara disterilkan terlebih dahulu dengan merendamnya dalam larutan kaporit selama 10-15 menit. Pencucian dilakukan dengan air dingin hasil rebusan dan ditiriskan hingga kering seperti langkah nomor 1.

Penyiapan Air Laut Sebagai Medium Kultur yang digunakan dalam penelitian berasal dari penyedia komersial dengan salinitas awal sebesar 30 ppt. Sterilisasi air laut tersebut terlebih dahulu dilakukan untuk memperkecil jumlah kontaminan berupa mikroorganisme lain yang terdapat di dalamnya. Cara konvensional yang ditempuh untuk sterilisasi air laut adalah merebus air laut hingga mendidih selama kurang lebih 2 jam, kemudian mendinginkannya hingga mencapai temperatur ruang (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Medium kultur diupayakan berada pada rentang pH optimum untuk produktivitas perairan, yaitu

7,5–8,5 (Basmi dkk, 2000). Sementara salinitas medium diupayakan berada pada konsentrasi tinggi , yaitu di atas 30 ppt dengan tujuan untuk menciptakan kondisi *stress* yang mampu mempercepat pertumbuhan (*stressed accelerated growth*) pada mikroalga (Bosma dan Wijffels, 2003). Air laut yang akan digunakan sebagai medium pertumbuhan *Chlorella* sp. tersebut selanjutnya dianalisis untuk mengetahui komposisi ammonium (NH_4^+), fosfat (PO_4^{2-}), nitrat (NO_3^-), dan nitrit (NO_2^-) awal tanpa penambahan dosis komposisi pupuk perlakuan penelitian.

Pembuatan larutan stok timbal diawali dengan menimbang $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan ke dalam gelas ukur dengan 100 mL aquades, dihomogenkan di atas *magnetic stirrer*. Larutan induk ini kemudian dipindah ke dalam Erlenmeyer 1000 mL dan ditambah aquades sebanyak 500 mL. Pengambilan stok timbal yang akan diperlakukan menggunakan rumus berikut (Gunawati, 2011):

$$V_1N_1=V_2N_2$$

Keterangan :

V1 = volume stok yang dicari

N1 = konsentrasi stok yang dicari

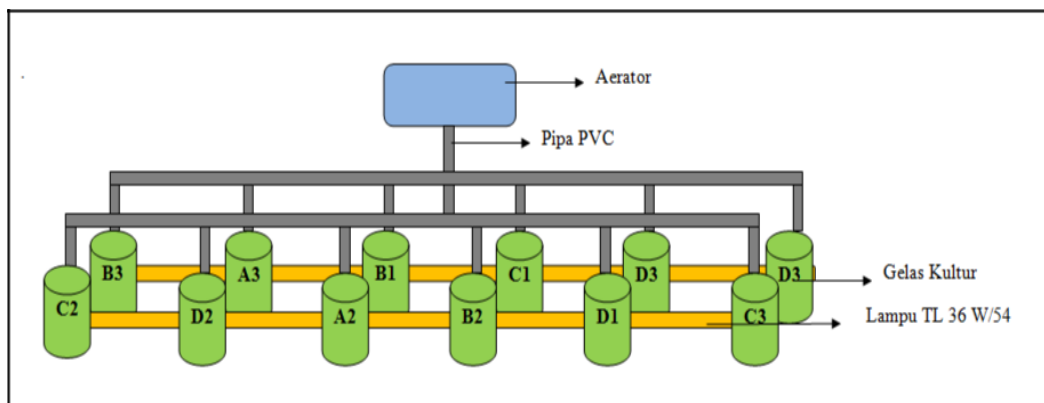
V2 = volume stok yang diketahui

N2 = konsentrasi stok yang diketahui

Penyiapan Bibit *Chlorella* sp. yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari laboratorium Balai Besar Budidaya Air Payau di daerah Situbondo. Menurut Prabowo (2009), bibit *Chlorella* sp. diaklimatisasi terhadap temperatur ruangan kultur selama 1 hari dengan menambahkan udara melalui aerator. Setelah aklimatisasi, bibit *Chlorella* sp. 1000 ml tersebut di-*scale up* hingga diperoleh *stock* kultur *Chlorella* sp. sebanyak 3 liter untuk masing-masing tahap penelitian. Berdasarkan *stock* kultur 3 liter tersebut kemudian disusun 12 kultur perlakuan *Chlorella* sp. yang akan digunakan dalam penelitian. Pembagian kultur *Chlorella* sp. dilakukan secara konvensional dan manual dengan menggunakan gelas ukur.

3.4.2 Susunan Peralatan Penelitian

Susunan peralatan kultur penelitian dilakukan dalam ruangan tertutup berada di laboratorium mikroalga Universitas Muhammadiyah Gresik. Prabowo (2009) mengemukakan Ruangan dikondisikan agar pertukaran gas dan cahaya dari dan ke dalam ruangan kultur tersebut terjamin minimal. Sumber cahaya di dalam ruangan kultur tertutup berasal dari empat lampu TL 36W/54 dan *air conditioner* (AC) yang berfungsi menjaga temperature ruangan pada kisaran 18-21^oC sehingga temperatur kultur dapat berada pada rentang 22-24^oC. Susunan peralatan kultur disajikan pada gambar 5.



Gambar 5. Susunan peralatan kultur

3.5 Pengamatan Penelitian

3.5.1 Parameter yang Diamati

Parameter utama yang diamati selama penelitian adalah sebagai kelimpahan sel *Chlorella* sp. (sel/ml) setiap hari pada masing-masing tahap kultur penelitian utama selama total 10 hari kultur secara mikroskopis menggunakan haemocytometer. Parameter tambahan yang diamati meliputi temperatur ruangan perubahan temperatur ruangan dan kultur (^oC) secara manual, salinitas kultur (ppt), orthoposphat dengan metode spektrofotometri, dan pH kultur.

3.5.2 Prosedur Pengambilan Data Penelitian

Prosedur pengambilan data penelitian dilakukan atas beberapa tahap, antara lain ;

1. Parameter Kualitas air

Pengukuran parameter kualitas air pada tahap awal sebelum dilakukan kultivasi adalah PO_4 , yang dilakukan dengan metode spektrofotometri. Sedangkan pengukuran parameter kualitas air harian meliputi ; temperatur dilakukan secara manual menggunakan thermometer ruangan maupun alkohol. Pengukuran salinitas dilakukan menggunakan refraktometer manual skala 0-100 ppm. DO harian diukur menggunakan DO meter pada jam 22.00 WIB sedangkan pengukuran pH dilakukan pada pagi pukul 07.00 dan sore pukul 16.00 WIB menggunakan pH pen. Untuk pengukuran temperatur yang dicatat adalah temperatur ketika penghitungan jumlah sel *Chlorella* sp. dilakukan.

2. Penghitungan Kelimpahan Sel *Chlorella* sp.

Penghitungan kelimpahan sel *Chlorella* sp. pada setiap tahap penelitian dilakukan dengan menggunakan *Haemocytometer Neubauer Improved* dengan cara mengambil sampel dari masing – masing perlakuan dalam botol sampel dan diteteskan pada permukaan *haemocytometer* yang kemudian ditutup menggunakan *cover glass*. Perhitungan dilakukan menggunakan perbesaran 40x pada blok E. (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995)

Menurut Edhy (2003) untuk pengamatan dengan sel yang ukurannya lebih dari 8 mikron dan tidak terlalu padat untuk dihitung, perhitungan dapat langsung dilakukan pada blok ABCD dan hasilnya dibagi 4. sedangkan sel dengan kepadatan tinggi perhitungan dilakukan pada blok E dan dikalikan dengan 10^4

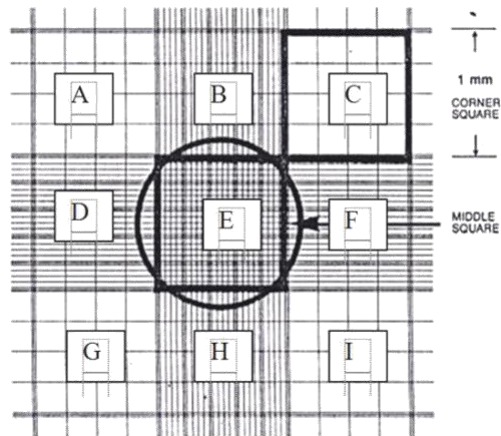
$$\text{sel/ml} = \Sigma \times 10^4$$

Dengan :

Σ = Jumlah sel dalam kotak hitung blok E *Haemacytometer*

10^4 = Volume air di kotak hitung blok E *Haemacytometer*

Penampang *Haemacytometer* akan disajikan pada gambar 6.



Gambar 6. Skema *haemocytometer neubauer improved*

(Sumber : www.phe-culturecollections.org.uk, 8 Juli 2017)

Merujuk penelitian yang dilakukan oleh Prabowo (2009) Hasil penghitungan kelimpahan sel *Chlorella* sp. per hari kemudian diplotkan untuk membuat kurva pertumbuhan sel dengan sumbu X menunjukkan hari kultur dan sumbu Y menunjukkan kelimpahan sel *Chlorella* sp.

3. Penentuan nilai MTC ion Pb oleh fitoplankton

Setelah diketahui pola pertumbuhan fitoplankton yang dikultur, penentuan pola pertumbuhan fitoplankton dilakukan dengan menghitung jumlah sel per milliliter medium setiap 24 jam. Menurut pratama, dkk (2002) Bila kepadatan sel masih normal, perhitungan kepadatan fitoplankton diperoleh kemudian ditentukan laju pertumbuhan spesifiknya (μ) setiap konsentrasi ion Pb yang dipaparkan. Untuk menentukan laju pertumbuhan spesifiknya (μ) menggunakan rumus:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

dengan :

N_t = Kepadatan populasi sel pada saat t (sel/mL)

N_0 = Kepadatan populasi sel pada saat awal (sel/mL)

μ = Tetapan laju pertumbuhan spesifik (jam⁻¹)

t = Waktu (jam)

4. Pengukuran Parameter Biologi (Klorofil-a)

Prosedur pengukuran klorofil-a pada fitoplankton sebagai berikut (Boyd, 1979 *dalam* Heriyanto, 2009) adalah dengan menyaring air sampel sebanyak 150 ml menggunakan filter milipore yang telah dibasahi 1 ml larutan magnesium karbonat dengan bantuan vakum syring. Membran filter yang mengandung klorofil-a dilipat empat kali sampai menjadi lipatan kecil, lalu dimasukkan ke dalam tissue grinder kemudian ditambah 5 ml aseton 90%. Menggerus larutan filter yang telah ditambah 5 ml aseton 90% sampai dengan hancur merata. Kemudian menambahkan lagi 3,5 ml aseton yang sama dan dilanjutkan penggerusan sampai semua bagian filter hancur. Memindahkan ke dalam tabung reaksi untuk disentrifus, tutup dengan penutup plastik, beri label. Sentrifus tabung- tabung ekstraksi pada putaran 3000 rpm selama 15 menit. Lalu penyerapan (absorbance) cairan bening diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 665 nm dan 750 nm. Kosentrasi klorofil-a dihitung dengan persamaan Vollenweider (1969) *dalam* Heriyanto (2009) sebagai berikut:

$$\text{Klorofil-a } (\mu\text{g/l}) = 11,9 (A^{0}_{665} - A^{0}_{750})^{-} \times 1000/S$$

Keterangan:

- A^{0}_{665} : penyerapan spektrofotometer pada panjang gelombang 665 nm
- A^{0}_{750} : penyerapan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm
- V : ekstrak aseton (ml)
- L : panjang jalan cahaya pada cuvet (cm)
- S : volume sampel yang difilter (ml)
- 11,9 : Konstanta

