

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah penggunaan limbah cair pabrik gula (Molase) terhadap kelimpahan *Tetraselmis chuii* serta analisa kualitas air yang berpengaruh langsung terhadap kelimpahan *Tetraselmis chuii*. Analisis tersebut meliputi parameter fisika diantaranya suhu, dan salinitas. Parameter kimia diantaranya derajat keasaman (pH), CO₂ bebas, nitrat, orthofosfat, dan. Serta parameter biologi diantaranya perhitungan kelimpahan *Tetraselmis chuii*.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan didalam penelitian ini adalah metode eksperimen atau percobaan dengan menggunakan Rancang Acak Kelompok (RAK) dengan pola tersarang sebanyak 5 perlakuan dan 3 ulangan. Menurut Hanafiah (2010), percobaan merupakan rangkaian dari proses coba-coba "trial" yang dilakukan dengan tujuan untuk menyelidiki ada atau tidaknya hubungan sebab-akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding.

Metode eksperimen dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pemberian limbah cair molase dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap pertumbuhan *Tetraselmis chuii*.

3.3 Sumber Data

Data yang diambil dalam penelitian ini meliputi data primer dan data sekunder. Data primer yang diambil terdiri dari kelimpahan *Tetraselmis chuii* serta parameter kualitas air dari media *Tetraselmis chuii*. Data sekunder yang

diambil terdiri dari informasi-informasi yang diperoleh dari jurnal, internet, buku, serta laporan penelitian sebelumnya.

3.4 Rancang Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancang Acak Kelompok (RAK) dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan diberikan dengan pemberian konsentrasi pupuk cair yang dibutuhkan *Tetraselmis chuii* yaitu : A (0,5 ppm), B (1,0 ppm), C (1,5 ppm), D (2,0 ppm). Penggunaan konsentrasi ini didasarkan dari hasil penelitian kandungan optimal N di perairan sebesar 2 ppm*. Adapun perhitungan konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 3 .

- K : Perlakuan kontrol (0 ppm)
- A : Perlakuan menggunakan pupuk limbah molase konsentrasi 0,5 ppm
- B : Perlakuan menggunakan pupuk limbah molase konsentrasi 1,0 ppm
- C : Perlakuan menggunakan pupuk limbah molase konsentrasi 1,5 ppm
- D : Perlakuan menggunakan pupuk limbah molase konsentrasi 2,0 ppm

Kandungan dari limbah molase sebelumnya telah diuji di Laboratorium Lingkungan FMIPA Universitas Brawijaya, Malang dengan hasil dapat dilihat pada Lampiran 2. Pupuk limbah molase memiliki kandungan diantaranya, kandungan carbon sebesar 27.34 % nitrogen sebesar 1.15 % Rasio C:N pupuk limbah molase adalah 23.77 % .

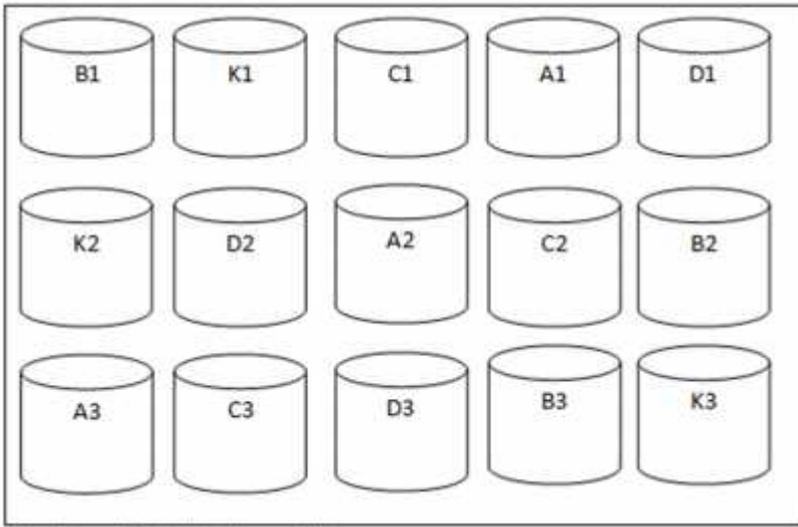
Rancangan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2 sebagai berikut :

Tabel 2. Rancangan penelitian

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
Kontrol	K1	K2	K3
Konsentrasi A	A1	A2	A3
Konsentrasi B	B1	B2	B3
Konsentrasi C	C1	C2	C3
Konsentrasi D	D1	D2	D3

*konsultasi khusus dengan dosen pembimbing

Adapun tata letak penelitian dapat dilihat pada Gambar 4 berikut ini:



Gambar 4. Tata letak penelitian

3.5 Prosedur Penelitian

Adapun rangkaian prosedur penelitian disajikan dalam Gambar 5 sebagai berikut :



Gambar 5. Rangkaian Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Media

a. Sterilisasi Alat

1. Sterilisasi peralatan berukuran besar dicuci kemudian dilap menggunakan Alkohol 98% lalu dijemur dibawah sinar matahari sampai kering.
2. Peralatan yang tidak tahan panas disimpan di tempat yang kering dan steril. Peralatan kecil dan terbuat dari kaca disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit.

b. Sterilisasi Media Tanah

1. Menjemur tanah tambak dengan bantuan sinar matahari hingga tanah tersebut kering sempurna (ditandai tanah yang retak-retak).
2. Mengoven tanah yang telah dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 110°C selama ± 1 jam. Tujuan dari pengovenan ini untuk mematikan organisme yang masih mungkin hidup, hal ini dilakukan agar saat digunakan dalam pengkulturan tidak timbul kontaminan terhadap organisme lain.
3. Menggiling tanah yang telah dioven untuk menghaluskan tanah yang keras tersebut, Barulah tanah siap digunakan dalam media tambahan pada penelitian.

c. Sterilisasi Air Laut

1. Menyaring air menggunakan planktonet.
2. Memasukkan air ke dalam botol kaca.
3. Menutup bagian mulut erlenmeyer menggunakan kapas yang telah dibungkus dengan kasa yang kemudian dilapisi lagi dengan alumunium foil.
4. Mensterilkan dengan *autoclave* uap pada suhu 121°C selama 20 menit

5. Menyimpan air laut yang sudah steril dan menggunakannya untuk pengkulturan.

3.5.2 Pembuatan Pupuk Cair dari Limbah Molase

Menurut Munawaroh (2013) Berikut adalah tahapan pembuatan pupuk cair dari limbah molase:

1. Menyiapkan limbah molase sebagai bahan yang akan digunakan sebagai pupuk dan EM4 sebagai cairan fermentasi.
2. Mengencerkan EM4 dengan aquades dengan perbandingan 1:20 (5%) yaitu EM4 sebanyak 32,4 ml dan aquades 648 ml dan didiamkan 5-7 hari.
3. Setelah proses pengenceran selesai, selanjutnya dilanjutkan proses fermentasi limbah molase menggunakan EM4 dengan perbandingan 20:1 (5%) sebanyak 648 ml EM4 aktif dengan 8.640 ml limbah molase yang kemudian difermentasikan selama 5 hari.
4. Selanjutnya pupuk siap digunakan sebagai pupuk.

3.5.3 Persiapan Penelitian

a. Persiapan Wadah Uji

1. Menyiapkan bak ($d = 30$ cm, $t = 10$ cm) sebanyak 15 buah.
2. Mencucinya sampai bersih.
3. Membilas dengan lap dan alkohol 98%.
4. Mengeringkannya dibawah sinar matahari.

b. Persiapan Media *Tetraselmis chuii*

Langkah-langkah yang yang dilakukan dalam persiapan media *Tetraselmis chuii* adalah:

1. Menyiapkan bak berdiameter 30 cm sebanyak 15 buah yang telah steril.
2. Menyiapkan media untuk kultur *Tetraselmis chuii* menggunakan volume 4,94 liter air laut.

3. Menambahkan tanah yang telah disterilkan setinggi 3 cm dari permukaan bak percobaan sebagai media pendukung dalam penelitian pemupukan.
4. Memasukkan limbah cair molase sesuai konsentrasi perlakuan dan memberi aerasi sampai tercampur rata.
5. Memasukkan bibit *Tetraselmis chuii* dengan kelimpahan.

c. Persiapan bibit *Tetraselmis chuii*

Penyiapan stok bibit *Tetraselmis chuii* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari pemesanan di Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, Jawa Timur. Stok bibit *Tetraselmis chuii* disimpan di dalam kulkas agar tetap bertahan hidup. Jumlah stok bibit *Tetraselmis chuii* yang akan ditebar dalam bak perlakuan dibuat sama rata. Diketahui jumlah *Tetraselmis chuii* pada stok adalah $3,6 \times 10^6$ sel/ml, sedangkan jumlah *Tetraselmis chuii* yang dikehendaki pada penebaran awal adalah 1×10^4 sel/ml. Menurut Boyd (1982), volume bibit atau jumlah bibit yang yang dibutuhkan untuk penebaran dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 3,6 \times 10^6 = 4.940 \text{ ml} \times 1 \times 10^4$$

$$V_1 = 13,72 \text{ ml}$$

Keterangan:

V_1 = Volume stok *Tetraselmis chuii* yang akan ditebar (ml)

N_1 = Kepadatan stok *Tetraselmis chuii* yang ada dalam toples (unit/ ml)

V_2 = Volume stok *Tetraselmis chuii* (ml)

N_2 = Kepadatan stok *Tetraselmis chuii* yang akan ditebar (unit/ ml)

3.5.4 Pelaksanaan Penelitian

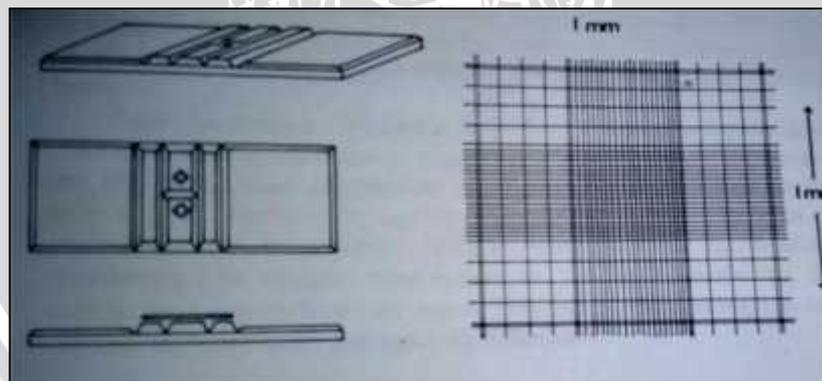
Langkah-langkah yang dilakukan dalam pelaksanaan penelitian, yaitu:

1. Meletakkan masing-masing bak secara acak sesuai perlakuan
2. Meletakkan tanah tambak yang telah disterilkan dengan ketinggian 3 cm.

3. Memasukkan air hingga tanah sedikit basah.
4. Menambahkan limbah cair molase ke setiap bak dengan konsentrasi yang sudah ditentukan
5. Mendiampkannya semalaman.
6. Menambahkan air laut ke setiap bak hingga 4,94 liter.
7. Melakukan penebaran bibit *Tetraselmis chuii* dengan kelimpahan yang sudah ditentukan
8. Mengamati pertumbuhan *Tetraselmis chuii* dilakukan setiap hari selama 14 hari pemeliharaan.
9. Mengamati parameter kualitas air seperti suhu, salinitas, CO₂ bebas, pH, nitrat, fosfat.

3.5.5 Menghitung Kelimpahan *Tetraselmis chuii*

Pertumbuhan *Tetraselmis chuii* (sel/mL) diamati setiap hari selama 14 hari pemeliharaan dengan bantuan mikroskop, serta gelas obyek khusus yakni Hemositometer.



Gambar 6. Hemositometer (Mudjiman, 1989)

Langkah-langkah yang dilakukan dalam persiapan media *Tetraselmis chuii* adalah:

1. Mengambil sebanyak 1 liter air berisi *Tetraselmis chuii* dari bak percobaan dengan *beaker glass*.

2. Menyaring air sampel dengan plankton net yang sudah dipasang botol sampel.
3. Mengambil 1 ml air sampel berisi plankton kemudian ditambahkan lugol 1-2 tetes.
4. Meneteskan air sampel berisi plankton diatas gelas obyek (Hemositometer) di bagian yang rendah dan berkotak-kotak, kemudian baru ditutup dengan gelas penutupnya.
5. Mengamati jumlah plankton dengan perbesaran 400x.
6. Perhitungan pertumbuhan *Tetraselmis chunii* menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah (sel/ml)} = \frac{N}{5} \times 25 \times \frac{1}{0,1} \times 1000 \times 35$$

Keterangan :

- N : jumlah sel yang diamati
- 5 : jumlah kotak besar yang diamati
- 25 : jumlah keseluruhan kotak besar
- 1 : luas 1 kotak besar (mm²)
- 0,1 : volume 1 kotak besar (mm³)
- 1000 : asumsi 0,1 mm³ → 1 cm³ (ml)
- 35 : kapasitas air yang tersaring
- 1000** : jumlah air yang disaring (1000ml)

Setelah dihitung menggunakan rumus perhitungan *Tetraselmis chunii* diatas, langkah selanjutnya adalah dilakukan pencatatan hasil pengamatan yang diperoleh serta diperoleh hasil pertumbuhan pada pengamatan pemeliharaan *Tetraselmis chunii* tersebut.

3.6 Analisis Parameter Kualitas Air

3.6.1 Suhu

Pengukuran suhu menurut SNI (2006) adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan termometer Hg.

2. Memasukkan termometer Hg ke dalam perairan selama 3 menit dan menunggu beberapa saat sampai air raksa dalam thermometer berhenti pada skala tertentu.
3. Mencatat dalam skala °C
4. Membaca skala pada saat termometer telah diangkat dari air dan jangan sampai tangan menyentuh bagian raksa termometer.

3.6.2 Salinitas

Pengukuran Salinitas dengan refraktometer menurut /kordi dan Tancung (2007) adalah sebagai berikut:

1. Mengambil air sampel menggunakan pipet tetes
2. Meneteskan pada optik refraktometer sebanyak 1 tetes
3. Melihat nilai salinitas pada refraktometer sebelah kanan dengan menggunakan cahaya matahari.

3.6.3 Derajat keasaman (pH)

Pengukuran pH dengan pH meter menurut SNI (2004) adalah sebagai berikut:

1. Mengkalibrasi elektrode dengan akuades
2. Mencilupkan elektrode ke dalam media (air kultur)
3. Menunggu sebentar sampai nilai pH-nya stabil atau tidak berubah
4. Membaca nilai pH-nya
5. Melihat angka yang tertera pada pH pen, setelah dipakai segera distandarisasi kembali.

3.6.4 CO₂ bebas

Pengukuran CO₂ bebas menurut Boyd (1979) adalah sebagai berikut:

1. Memasukkan 25 ml air sampel ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 1-2 tetes indikator PP

- a. Bila warna air bewarna merah muda berarti air tersebut tidak mengandung CO₂ bebas.
 - b. Bila air tetap tidak bewarna setelah ditambahi PP, cepat titrasi dengan Na₂CO₃ 0.0454 N hingga bewarna merah muda pertama kali.
2. Volume Na₂CO₃ yang digunakan (ml titran) dicatat. Selanjutnya kadar karbondioksida dalam perairan tersebut dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{CO}_2 \text{ (mg/L)} = \frac{V \text{ titran} \times N \text{ titran} \times 22 \times 1000}{V \text{ air sampel}}$$

Keterangan :

- V titran : Jumlah larutan Na₂CO₃ yang terpakai.
 N Titran : Normalitas larutan Na₂CO₃ (0,0454)
 22 : Nilai ½ Mr CO₂
 1000 : Asumsi 1Liter (1000ml)
 V air sampel : Volume air yang diukur kadar CO₂ bebasnya (25 ml)

3.6.5 Nitrat (NO₃)

Pengukuran nitrat menurut Boyd (1979) adalah sebagai berikut:

1. Menyaring sampel 12,5 ml dan menuangkan kedalam cawan porselen
2. Memanaskan cawan berisi sampel diatas *hot plate* hingga kering terbentuk kerak kemudian didinginkan
3. Menambahkan 1 ml asam fenol disulfonik aduk dengan spatula,
4. Mengencerkan dengan 10ml aquades
5. Menambahkan dengan meneteskan NH₄OH sampai terbentuk warna kuning.
6. Mengencerkan dengan aquades sampai 12,5ml lalu masukkan kedalam cuvet.
7. Membandingkan dengan larutan standart pembanding yang telah dibuat dengan spektrofotometer (dengan panjang gelombang 410µm).

3.6.6 Orthofosfat

Pengukuran orthofosfat menurut Boyd (1979) adalah sebagai berikut:

1. Menyaring air sampel sejumlah 25 ml sampel dengan menggunakan kertas saring.
2. Tambahkan dengan 1 ml amonium molybdate, aduk.
3. Tambahkan 3-5 tetes SnCl_2 , aduk diamkan 15 menit.
4. Membandingkan dengan larutan standart pembanding yang telah dibuat dengan spektrofotometer (dengan panjang gelombang 690nm).

3.7 Analisis Data

Penelitian yang berjudul Pengaruh Pemanfaatan Limbah Molase dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Kelimpahan *Tetraselmis chuii* menggunakan rancangan acak kelompok pola tersarang dengan 3 kali ulangan dalam setiap perlakuan dengan melakukan perhitungan laju pertumbuhan *Tetraselmis chuii* selama penelitian yaitu selama 14 hari pengamatan, kemudian analisa data menggunakan analisa keragaman (ANOVA). Tujuannya untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh pemberian perlakuan serta untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan dari waktu selama penelitian. Apabila dari analisa keragaman (sidik ragam) diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata, maka untuk membandingkan nilai dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda.

Model rancangan tersarang menurut Sastrosupadi (2000), sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + T_{j(i)} + \epsilon_{(k)ij}$$

$$i = 1, 2, 3, 4, 5, \dots, a \quad j = 1, 2, 3, 4, \dots, b \quad \text{dan} \quad k = 1, 2, 3, \dots, r$$

Keterangan :

Y_{ijk} : Respon yang diamati

μ : Rata-rata umum

α_i : Pengaruh kelompok ke i

β_j : Pengaruh perlakuan ke j

$T_{j(i)}$: Pengaruh j yang ada dalam i

$\epsilon_{(k)ij}$: Galat karena pengamatan ke k waktu j yang ada dalam perlakuan i

Selanjutnya, data yang diperoleh diuji menggunakan analisa sidik ragam.

Tabel analisa sidik ragam untuk rancangan acaka lengkap disajikan pada Tabel

3. sebagai berikut :

Tabel 3. Analisa Sidik Ragam

Perlakuan		Ulangan			Total	Rata-Rata
		1	2	3		
kontrol	1	y1	y36	y71	j1	y1
	2	y2	y37	y72	j2	y2
	3	y3	y38	y73	j3	y3
	4	y4	y39	y74	j4	y4
	5	y5	y40	y75	j5	y5
	6	y6	y41	y76	j6	y6
	7	y7	y42	y77	j7	y7
0.5 ppm	1	y8	y43	y78	j8	y8
	2	y9	y44	y79	j9	y9
	3	y10	y45	y80	j10	y10
	4	y11	y46	y81	j11	y11
	5	y12	y47	y82	j12	y12
	6	y13	y48	y83	j13	y13
	7	y14	y49	y84	j14	y14
1.0 ppm	1	y15	y50	y85	j15	y15
	2	y16	y51	y86	j16	y16
	3	y17	y52	y87	j17	y17
	4	y18	y53	y88	j18	y18
	5	y19	y54	y89	j19	y19
	6	y20	y55	y90	j20	y20
	7	y21	y56	y91	j21	y21
1.5 ppm	1	y22	y57	y92	j22	y22
	2	y23	y58	y93	j23	y23
	3	y24	y59	y94	j24	y24
	4	y25	y60	y95	j25	y25
	5	y26	y61	y96	j26	y26
	6	y27	y62	y97	j27	y27
	7	y28	y63	y98	j28	y28
2.0 ppm	1	y29	y64	y99	j29	y29
	2	y30	y65	y100	j30	y30
	3	y31	y66	y101	j31	y31
	4	y32	y67	y102	j32	y32
	5	y33	y68	y103	j33	y33
	6	y34	y69	y104	j34	y34
	7	y35	y70	y105	j35	y35
Total		jk1	jk2	jk3		

Dari data diatas, maka dapat dihitung nilai dari :

Faktor Koreksi = $\frac{y^2}{abr}$

Jumlah Kuadrat Total (JKT) = $(\sum Y_{ijk})^2$

Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP) = $\frac{\sum y_i^2}{br} - \frac{FK}{r}$

Jumlah Kuadrat Waktu dalam Perlakuan (JKW_(p)) = $\frac{\sum (y_{i1}^2 + y_{i2}^2 + \dots + y_{i2}^2)}{r} - \frac{FK}{br}$

Jumlah Kuadrat Galat = $JKT - FK - JKP - JKW_{(p)}$

Berdasarkan perhitungan diatas, selanjutnya dapat dilakukan analisa keragaman untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Adapun uraian analisa keragaman dapat dilihat pada Tabel 4 sebagai berikut:

Tabel 4. Analysis of Varian (ANOVA)

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftab (5%)	Ftab (1%)
Perlakuan	a-1	$\sum_{i=1}^a \frac{y_i^2}{bn} - \frac{y^2}{abn}$	JKp/Dbp	KTp/KTg	Tabel	Tabel
Waktu (dalam Perlakuan)	a(b-1)	$\sum_{i=1}^a \frac{y_{i1}^2 + y_{i2}^2 + \dots + y_{i2}^2}{r} - \frac{y_i^2}{br}$	JKw(p)/Dbw(p)	KTw(p)/J Kg		
Galat	ab(n-1)	JKT - JKP - JKW(p)	JKg/Dbg			
Total	abn-1	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n Y_{ijk}^2 - \frac{y^2}{abn}$				

Kesimpulan :

- Jika Fhitung > Ftabel 5% dan Ftabel 1% maka perlakuan berbeda sangat nyata.
- Jika Fhitung > Ftabel 5% tetapi lebih kecil dibanding Ftabel 1% maka berbeda nyata.
- Jika Fhitung < Ftabel 5% dan Ftabel 1% maka tidak berbeda.



Apabila dalam kesimpulan analisa diperoleh hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka harus dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dari masing-masing perlakuan. Rumus perhitungan uji BNT sebagai berikut :

$$BNT (5\%) = t_{0,05} (DBG) \times \sqrt{\frac{2KTG}{bn}}$$

Kesimpulan :

- Jika nilai uji BNT > selisih rata-rata maka tidak ada pengaruh yang nyata (tidak berbeda nyata).
- Jika nilai uji BNT < selisih rata-rata maka diantara kedua perlakuan ada pengaruh yang nyata (berbeda nyata).

Selanjutnya untuk menentukan konsentrasi maksimal pupuk organik limbah molase yang digunakan, menggunakan analisa respon permukaan dengan metode polinomial ortogonal yang dinyatakan dalam fungsi matematik menurut Gomez (1984), sebagai berikut:

$$JK(Q) = Q^2 / r (c^2)$$

$$JK(Q) = \frac{\{(+2)(T1) + (-1)(T2) + (-2)(T3) + (-1)(T4) + (+2)(T5)\}^2}{r(\sum c^2)}$$

Dengan koefisien polinomial ortogonal dengan Quadratik dapat dilihat pada

Tabel 5. sebagai berikut:

Tabel 5. Koefisien Polinomial Ortogonal

Derajat polinomial	Koefisien Polinomial Orthogonal					c ²
	T1	T2	T3	T4	T5	
Linier	-2	-1	0	+1	+2	10
Quadratik	+2	-1	-2	-1	+2	14

Persamaan regresi kudratik

$$Y = a + bx + cx^2$$

Keterangan

a : Intersep

b : koefisien regresi sebagian (i=1,.....,n)

Dimana :

$$b = \frac{(\sum x_2^2)(\sum x_1 y) - (\sum x_1 x_2)(\sum x_2 y)}{(\sum x_1)^2(\sum x_2)^2 - (\sum x_1 x_2)^2}$$

$$c = \frac{(\sum x_1^2)(\sum x_2 y) - (\sum x_1 x_2)(\sum x_1 y)}{(\sum x_1)^2(\sum x_2)^2 - (\sum x_1 x_2)^2}$$

$$a = \bar{Y} - b_1 - c_2$$

$$a = \bar{Y} - b_1 - c_2$$

Selanjutnya untuk menentukan konsentrasi maksimal, dengan syarat baku

Y' (turunan pertama) = 0, dari turunan rumus regresi kuadratik :

$Y = a + bx + cx^2$, diperoleh

$$0 = b + 2cx$$

$$x = -\frac{b}{2c}$$

