

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah penggunaan pupuk organik, yaitu yang berasal dari limbah industri hasil perikanan terhadap kelimpahan *Tetraselmis chuii* serta analisa kualitas air sebagai faktor pendukung pertumbuhan *Tetraselmis chuii*. Analisis tersebut meliputi parameter fisika diantaranya suhu, dan salinitas. Parameter kimia diantaranya derajat keasaman (pH), Oksigen terlarut (DO), karbondioksida, nitrat, dan orthofosfat. 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 Tersarang dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan (kelompok). Menurut Hanafiah (2010), percobaan merupakan rangkaian dari proses coba-coba "trial" yang dilakukan dengan tujuan untuk menyelidiki ada atau tidak adanya hubungan sebab-akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding.

Perlakuan dari penelitian ini adalah penggunaan limbah pengolahan ikan industri hasil perikanan sebagai pupuk organik dalam meningkatkan pertumbuhan *Tetraselmis chuii*, dengan pemberian dosis yang berbeda yaitu : A (0 ppm), B (0,5 ppm), C (1 ppm), D (1,5 ppm), E (2 ppm) pada bak-bak percobaan dengan ukuran diameter 30 cm dan tinggi 10 cm. Dosis ditentukan dari besarnya kandungan optimal nitrat pada perairan, berdasarkan penelitian-

penelitian terdahulu, kandungan nitrat yang optimal adalah sebesar 2 ppm. Adapun untuk perhitungan dosis, dapat dilihat pada lampiran 1.

Limbah yang dipakai didalam penelitian ini diambil dari salah satu rumah industri pembuatan abon dan ikan olahan di pantai Sendang Biru, kabupaten Malang. Jenis limbah yang diambil berupa kepala, sirip, jeroan, dan air cucian ikan yang kemudian dihancurkan. Sebelum limbah digunakan, dilakukan uji pendahuluan yaitu dengan melakukan proses mineralisasi oleh bakteri EM4. Untuk mengetahui kadar nitrat tertinggi dari pupuk limbah industri hasil perikanan, maka dilakukan pengukuran nitrat setiap hari, dan didapatkan nitrat tertinggi pada hari kelima yaitu sebesar 12,99 ppm, maka pada hari kelima mineralisasi digunakan sebagai hari untuk memasukkan limbah ke media penelitian pada saat uji inti atau penelitian sesungguhnya.

Pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan mengambil dua macam sumber data, yaitu data primer dan data sekunder. Data primer yang diambil terdiri dari kelimpahan *Tetraselmis chuii*, serta parameter kualitas air meliputi suhu, derajat keasaman (pH), Oksigen terlarut (DO), nitrat, dan orthofosfat. Penelitian dilakukan selama 13 hari. Pada penelitian tersebut pengambilan data kualitas air suhu, pH, DO, salinitas dilakukan selama 2 hari sekali, sedangkan karbondioksida (CO₂), nitrat, dan orthofosfat diukur pada hari pertama, ke tujuh, dan hari terakhir. Sedangkan data sekunder yang diambil terdiri dari informasi-informasi yang diperoleh dari buku, jurnal, internet, serta laporan penelitian lainnya.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Pola Tersarang. Menurut Sudjana (1994), eksperimen dengan sifat bahwa taraf faktor yang satu tersarang dalam faktor yang lain disebut *eksperimen tersarang*. Rancangan

Acak Kelompok Pola Tersarang pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui pengaruh perbedaan dosis limbah industri pengolahan hasil perikanan sebagai pupuk organik terhadap pertumbuhan *Tetraselmis chuii*. Untuk membandingkan dan mendapati perlakuan terbaik dilakukan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Model linear rancangan acak Kelompok Pola Tersarang adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_{j(i)} + K_k + \epsilon_{k(ij)}$$

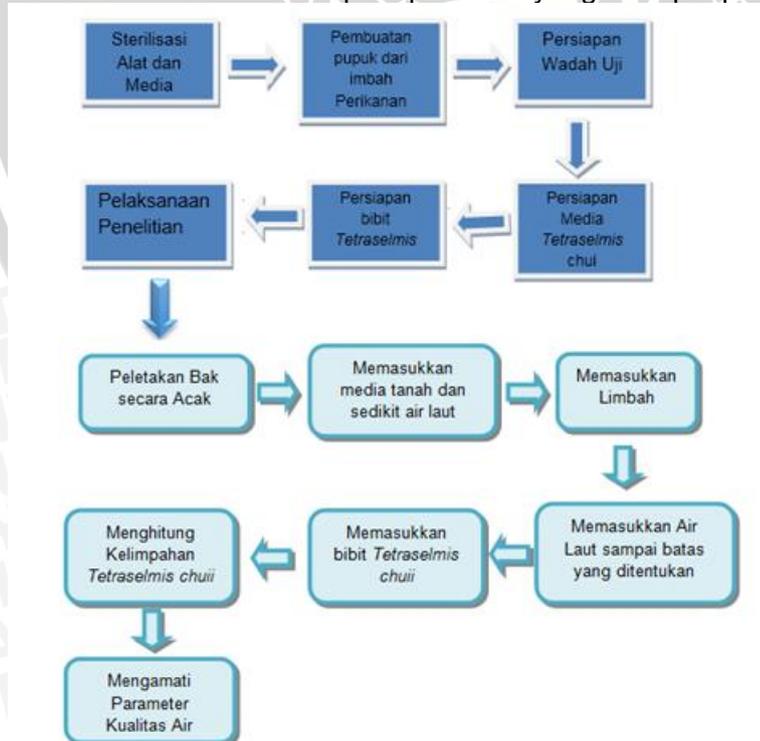
$i = 1, 2, \dots, a$ $j = 1, 2, \dots, b$ dan $k = 1, 2, \dots, r$

Keterangan :

- Y_{ijk} : Respon yang diamati
- μ : Rata-rata umum
- K_k : Pengaruh Kelompok ke- i
- A_i : Pengaruh Perlakuan ke- i
- $B_{j(i)}$: Pengaruh j yang ada dalam i
- $\epsilon_{k(ij)}$: Galat karena pengamatan ke k waktu j yang ada dalam perlakuan

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan seperti prosedur yang terdapat pada Gambar 3.



Gambar 3. Alur Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat dan bahan

Sebelum melakukan kultur *Tetraselmis chuii*, alat dari media yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu untuk menghindari kontaminasi.

a. Sterilisasi Air Laut sebagai Media Kultur

Penelitian ini juga menggunakan tanah sebagai medianya. Tanah berfungsi untuk mempercepat proses dekomposisi dan sebagai stabilisator lingkungan. Langkah-langkah yang dilakukan pada sterilisasi air laut sebagai media kultur antara lain :

1. Menyaring air menggunakan planktonet
2. Memasukkan air ke dalam erlenmeyer
3. Menutup bagian mulut erlenmeyer menggunakan kapas yang telah dibungkus dengan kasa yang kemudian dilapisi lagi dengan alumunium foil.
4. Mensterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Sterilisasi Tanah sebagai Media Kultur

Langkah-langkah yang dilakukan pada sterilisasi tanah sebagai media kultur antara lain :

1. Memanaskan oven dengan suhu awal 60°C
2. Meletakkan tanah kedalam loyang
3. Apabila oven telah mencapai suhu 60°C , loyang yang berisi tanah dimasukkan kedalam oven.
4. Tutup oven, dan suhu dinaikkan hingga 120°C
5. Ditunggu kurang lebih 30 menit
6. Angkat loyang, dan matikan oven.

3.4.2 Persiapan Penelitian

- a. Persiapan wadah dan perlatan penunjang lainnya

Menyiapkan bak dan peralatan penunjang lainnya yang sudah disterilisasi.

b. Persiapan media *Tetraselmis chuii*

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

1. Menyiapkan bak yang telah steril
2. Menyiapkan media untuk kultur *Tetraselmis chuii* menggunakan volume 5 liter air laut dan tanah dengan tinggi 3 cm.
3. Memasukkan limbah ikan sesuai perlakuan dosis yang telah ditentukan.
4. Memasukkan bibit *Tetraselmis chuii*.

c. Persiapan bibit *Tetraselmis chuii*

Menurut Kurniasih (2001), Bibit *Tetraselmis chuii* yang diambil dari stok dihitung kelimpahan tebarannya dengan rumus:

$$N1 \times V1 = N2 \times v2$$

Keterangan :

- N1 : Kelimpahan awal
V1 : Volume sampel awal
N2 : Kelimpahan kultur yang dikehendaki
V2 : Volume kultur yang dikehendaki

3.4.3 Pelaksanaan Penelitian

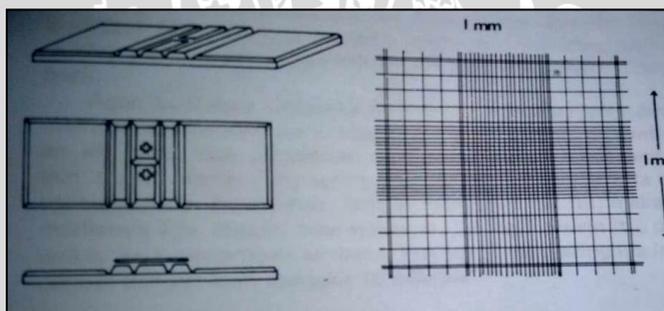
Langkah-langkah yang dilakukan dalam pelaksanaan penelitian, yaitu:

1. Meletakkan masing-masing bak secara acak sesuai perlakuan
2. Memasukkan media tanah dengan tinggi 3 cm dan sedikit air laut ke setiap bak.
3. Mencampurkan pupuk dari limbah ikan hasil industri ke setiap bak dengan dosis yang sudah ditentukan
4. Menambahkan air laut sesuai batas yang ditentukan

5. Melakukan penebaran bibit *Tetraselmis chuii* dengan kelimpahan yang sudah ditentukan
6. Mengamati kelimpahan mikroalga dimulai dari hari pertama penebaran dengan mikroskop.
7. Mengamati parameter kualitas air seperti suhu, salinitas, pH, DO, CO₂, nitrat, dan fosfat.

3.4.4 Menghitung kelimpahan *Tetraselmis chuii*

Pertumbuhan *Tetraselmis chuii* (sel/mL) diamati setiap hari selama 13 hari pemeliharaan. Pertumbuhan *Tetraselmis chuii* diamati dengan parameter kualitas air meliputi suhu, pH, DO, CO₂, nitrat, ortofosfat, salinitas. Pengamatan jumlah kelimpahan *Tetraselmis chuii* dilakukan setiap hari dengan bantuan mikroskop, serta gelas obyek khusus yakni Hemositometer.



Gambar 4. Hemositometer (Mudjiman, 1989)

Menghitung kepadatan plankton diawali dengan pengambilan sampel air sebanyak 1 liter, kemudian disaring menggunakan planktonet yang sudah terdapat botol film 35 ml. Setelah itu diambil 1ml untuk diamati. Untuk jenis plankton yang bergerak aktif seperti *Tetraselmis chuii*, maka sampel air berisi plankton tersebut perlu dilumpuhkan terlebih dahulu dengan menambahkan sedikit lugol kemudian ditunggu 5-10 menit baru kemudian dapat diamati. Perhitungan pertumbuhan *Tetraselmis chuii* adalah:

$$= \left\{ n \times 25 \times \frac{1 \text{ mm}^3}{0,1 \text{ mm}^3} \times 1000 \text{ cm}^3 \times 35 \right\} / 1000 \text{ cm}^3$$

Keterangan :

- n = rata-rata individu yang ditemukan
- 25 = Jumlah seluruh lapang pandang di haemositometer
- 35 = volume botol film yang digunakan

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

3.5 Analisis Parameter Kualitas Air

a. Suhu

Menurut SNI (2006), pengukuran suhu dapat dilakukan dengan cara 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.

b. Salinitas

Menurut Kordi dan Tancung (2007), pengukuran salinitas dengan menggunakan refraktometer dilakukan dengan cara 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.

c. Derajat keasaman (pH)

Menurut SNI (2004), untuk mengetahui nilai pH dapat diukur dengan menggunakan pH meter yaitu dengan cara :

1. Mengkalibrasi elektrode dengan akuades
2. Mencelupkan 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.

d. Oksigen terlarut (DO)

Menurut SNI (2006), menjelaskan bahwa prosedur analisis oksigen terlarut adalah sebagai berikut:

- a. Menstandartkan alat ukur (DO meter)
- b. Membilas elektrodanya menggunakan aquades kemudian dikeringkan dengan menggunakan kertas tisu.
- c. Memasukkan elektroda ke dalam perairan
- d. Mencatat angka yang tertera pada alat sebagai hasil pengukuran DO.

e. Karbondioksida (CO₂)

Pengaruh kadar karbondioksida (CO₂) menurut Boyd (1982) adalah sebagai berikut :

1. Memasukkan 25 ml air sampel kedalam Erlenmeyer, sebisa mungkin kurangi pengaruh aerasi.
2. Menambahkan 3-4 tetes indicator PP
3. Bila air berwarna pink berarti air tersebut tidak mengandung CO₂ bebas
4. Bila air sampel tetap tidak berwarna, dititrasi dengan NA₂CO₃ 0,0454 N sampai warna menjadi pink pertama kali
5. Menghitung kadar CO₂ dengan rumus :

$$\text{CO}_2 \text{ bebas (mg/L)} = \frac{\text{ml (titran)} \times \text{N (titran)} \times 44}{2 \times 1000} \text{ ml air sampel}$$

f. Nitrat (NO₃)

Menurut Boyd (1982) menjelaskan bahwa prosedur pengukuran nitrat (NO_3) 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. Menambahkan dengan meneteskan NH_4OH sampai terbentuk warna.
5. Mengencerkan dengan aquades sampai 12,5ml lalu masukkan kedalam cuvet.
6. Membandingkan dengan larutan standart pembanding yang telah dibuat dengan spektrofotometer (dengan panjang gelombang $410\mu\text{m}$).

g. Orthofosfat

Pengukuran kandungan orthofosfat menurut Boyd (1982) adalah sebagai berikut :

1. Menuangkan sampel sebanyak 25ml ke dalam erlenmeyer dengan gelas ukur.
2. Menambahkan 1 ml ammonium molybdate kedalam masing-masing larutan standart yang telah dibuat dan dihomogenkan.
3. Menambahkan 3-5 tetes SnCl_2 warna biru akan timbul (10-12menit) sesuai dengan kadar fosfatnya.
4. Memasukkan larutan (no.3) ke dalam cuvet
5. Membandingkan warna biru air sampel dengan larutan standar pembanding dengan spektrofotometer (panjang gelombang $690\mu\text{m}$).

3.6 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancang Acak Kelompok Pola Tersarang dengan 5 pelakuan dan 3 ulangan (kelompok). Analisis data dilakukan dengan

menggunakan analysis of varians (ANOVA) dan jika dari analisis keragaman diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (signifikan) atau sangat berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), uji BNT dilakukan untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda. Berikut merupakan perhitungan regresi dari RAK Tersarang :

1. Faktor Koreksi ($\sum Y^2$) = $(x_1)^2 + (x_2)^2 + (x_3)^2 + \dots + (x_{105})^2 =$
2. $Ry = \frac{(Ga + Gb + Gc + Gd + Ge)^2}{rb}$
3. $Gy = \frac{(Ga)^2 + (Gb)^2 + (Gc)^2 + (Gd)^2 + (Ge)^2}{rb} - Ry =$
4. Jumlah Kuadrat Kontrol = $\frac{(a_1)^2 + (a_3)^2 + \dots + (a_{13})^2}{r} - \frac{(Ta)^2}{rb}$
5. Jumlah Kuadrat 0,5 ppm = $\frac{(b_1)^2 + (b_3)^2 + \dots + (b_{13})^2}{r} - \frac{(Tb)^2}{rb}$
6. Jumlah Kuadrat 1 ppm = $\frac{(c_1)^2 + (c_3)^2 + \dots + (c_{13})^2}{r} - \frac{(Tc)^2}{rb}$
7. Jumlah Kuadrat 1,5 ppm = $\frac{(d_1)^2 + (d_3)^2 + \dots + (d_{13})^2}{r} - \frac{(Td)^2}{rb}$
8. Jumlah Kuadrat 2 ppm = $\frac{(e_1)^2 + (e_3)^2 + \dots + (e_{13})^2}{r} - \frac{(Te)^2}{rb}$
9. Jumlah Kuadrat Total (JKT) = $JK_{Kontrol} + JK_{0,5} + JK_1 + JK_{1,5} + JK_2$
10. $Ey = \sum Y^2 - Ry - Gy - JKT$

Berdasarkan perhitungan diatas, selanjutnya dapat dilakukan analisa keragaman (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Adapun uraian analisa keragaman dapat dilihat pada tabel 3 sebagai berikut:

Tabel 3. Analisa of Varians (ANOVA)

SV	Dk	JK	KT	F _{hitung}	F _{tab (5%)}	F _{tab (1%)}
Perlakuan (Ai)	(a-1)	Gy	Gy/dka	KTA/KTG		
Waktu dalam perlakuan Bj(i)	a(b-1)	JKT	JKT/dkb	KTb/KTG		
Galat €k(ij)	ab(r-1)	Ey	Ey/dkk			
Jumlah	Abr	$\sum Y^2$				



Kesimpulan :

1. Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ 5% dan F_{tabel} 1% maka perlakuan berbeda sangat nyata.
2. Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ 5% maka ada perbedaan nyata yang berarti H_1 diterima pada taraf uji 5%.
3. Jika $F_{hitung} < F_{tabel}$ 5% dan 1% maka tidak ada perbedaan nyata, sehingga H_0 diterima.

3.6.1 Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

Apabila dalam kesimpulan analisa diperoleh hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka harus dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dari masing-masing perlakuan. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menurut Sastrosupadi (1995) adalah :

$$BNT = t\alpha \sqrt{\frac{2KTG}{r}}$$

Kesimpulan :

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

3.6.2 Metodologi Permukaan Respon/ Polinomial Ortogonal

Metodologi permukaan respon (respon surface methodology) adalah suatu kumpulan dari teknik-teknik statistika dan matematika yang berguna untuk menganalisis permasalahan tentang beberapa variabel bebas yang mempengaruhi variabel tak bebas atau respons, serta bertujuan untuk mengoptimalkan respon itu (Gaspersz, 1992). Untuk menentukan dosis maksimal pupuk organik limbah perikanan dalam pertumbuhan *Tetraselmis chuii*,

digunakan Metode Polinomial Ortogonal dengan derajat Polinomial Kuadratik. Menurut Gomez (1985), untuk perlakuan dengan selang yang sama (0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm) derajat Polinomial Kuadratik didapatkan :

Tabel 4. Koefisien polinomial Ortogonal

Derajat Polinomial	Koefisien Polinomial Ortogonal (c)					Jumlah Kuadrat ($\sum c^2$)
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	
Linear	-2	-1	0	+1	+2	10
Kuadratik	+2	-1	-2	-1	+2	14

Persamaan Regresi Kuadratik :

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

Keterangan :

a = intersep

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

Dimana :

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

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

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}_1 - c\bar{X}_2$$

Selanjutnya untuk menentukan dosis maksimal yaitu dengan syarat $y' = 0$. Dari turunan rumus regresi kuadratik :

$$y = a + bx + cx^2, \text{ Sehingga :}$$

$$0 = b + 2cx$$

$$x = -b/2c$$