

III. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

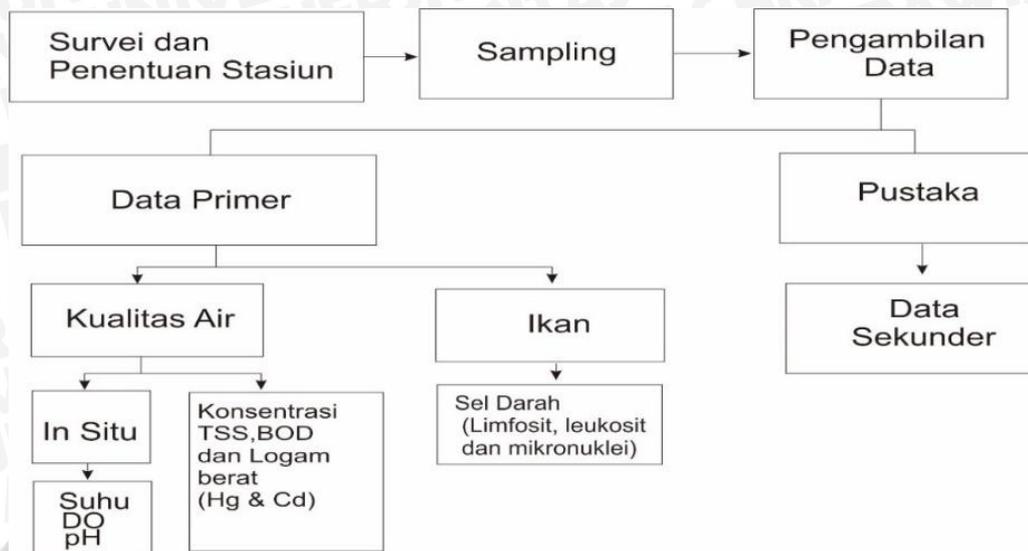
Materi yang dibahas dalam penelitian ini adalah darah dari Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) yang ditangkap dari Sungai Rejoso Kecamatan Rejoso Kabupaten Pasuruan, Provinsi Jawa Timur, yang kemudian diamati eritrosit, limfosit dan mikronuklei. Untuk lokasi pengambilan ikan dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3 Metode Penelitian

Metode Pengambilan data adalah metode deskriptif. Penelitian deskriptif melakukan analisis hanya sampai sebatas pada taraf deskripsi, yaitu menganalisis dan menyajikan fakta secara sistematis sehingga dapat lebih mudah untuk dipahami dan disimpulkan. Sedangkan penelitian deskriptif ini bertujuan menggambarkan secara sistematis dan akurat fakta dan karakteristik mengenai populasi atau bidang tertentu (Azwar, 2010). Pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua data utama yaitu data primer dan data sekunder. Data pertama adalah data primer yang didapatkan langsung dari hasil observasi dan pengukuran data secara langsung di lapang sedangkan data sekunder adalah data pendukung berupa literatur atau perbandingan dari hasil penelitian. Diagram alir metode pengumpulan data yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema Metode Penelitian

3.4 Penentuan Stasiun Pengamatan

Sebelum melakukan penelitian, terlebih dahulu ditetapkan tempat pengambilan sampel atau stasiun dengan melihat lokasi agar memudahkan mekanisme pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan di sepanjang sungai Rejoso, peta disajikan pada Lampiran 2. Penentuan stasiun didasarkan pada jarak lokasi dengan pipa pembuangan limbah PT Cheil Jedang sebagai berikut :

Stasiun 1 : Merupakan lokasi pembuangan limbah Pabrik

Stasiun 2 : Pertemuan antara irigasi pertanian dengan air dari arah stasiun . 1

Stasiun 3 : Merupakan pemukiman penduduk.

3.4.1 Pengambilan Sampel Ikan

Pengambilan sampel ikan dilakukan dengan menggunakan pancing. Sampel ikan Tawes (*Puntius javanicus*) diambil di Sungai Rejoso Kecamatan Rejoso Kabupaten Pasuruan, Provinsi Jawa Timur. Pengambilan ikan dilakukan pada tiap – tiap stasiun yang sudah ditentukan dan dilakukan pengukuran kualitas air.

Masing - masing Stasiun diambil 3 ekor ikan tawes, jadi jumlah ikan yang diambil sebanyak 9 ekor ikan. Ikan yang telah ditangkap kemudian di masukkan dalam kantong plastik yang telah diberi air dari sungai tersebut dan diberi oksigen. Kemudian sampel ikan dibawa ke Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang untuk di ambil sampel darahnya.

3.4.2 Pengambilan Sampel Air

Pada tiap – tiap stasiun yang telah ditentukan, dilakukan pengukuran DO, pH dan Suhu. Pengukuran DO dan Suhu dengan menggunakan alat yaitu DO meter. Sedangkan pengukuran pH dengan menggunakan pH pen.

Untuk pengukuran kualitas air lainnya seperti BOD, COD, TSS, serta logam berat Hg dan Cd dilakukan di laboratorium Jasa Tirta Malang. Sampel air diambil dari stasiun – stasiun yang telah ditentukan dengan menggunakan botol kaca, kemudian disimpan dalam *cooldbox* dan diberi es batu. Sedangkan untuk sampel air yang akan di ukur nilai Hg dan Cd nya sampel dibawa ke laboratorium Fakultas Kimia Universitas Brawijaya.

3.5 Analisa Sampel

3.5.1 Analisa Darah

a) Pengambilan Darah Ikan (Bijanti, 2005)

Pengambilan sampel darah ikan berukuran besar (> 10cm). Prosedur pengambilan darah ikan sebagai berikut :

- 1) Membius ikan dengan menggunakan larutan anastesi
- 2) Menyiapkan mikro spuit lengkap dengan jarumnya, hisap larutan antikoagulan sampai memenuhi seluruh dinding syringe.
- 3) Mengeluarkan larutan tikoagulan dari spuit, sisakan larutan heparin tersebut sebanyak $\pm 50 \mu\text{l}$ dalam spuit.

- 4) Menusukkan jarum / spuit dan jarumnya yang telah berisi larutan tikoagulan pada garis tengah tubuh di belakang sirip anal.
- 5) Memasukkan jarum kedalam musculus sampai mencapai tulang belakang (columna spinal).
- 6) Memastikan tidak ada gelembung air yang masuk kedalam spuit, kemudian ditarik perlahan – lahan sampai darah masuk kedalam spuit.
- 7) Memasukkan darah ke dalam tabung endov.

b) Pengamatan Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit) (Bijanti, 2005)

Peralatan yang digunakan adalah pipet eritrosit ukuran 11 μL , cover glass, kamar hitung Neubauer, Mikroskop Cahaya, Counter. Bahan yang digunakan adalah sampel darah ikan, Natrium Sitrat 3,8% (anti koagulan) dan larutan hayem. Prosedur kerja pengamatan jumlah sel darah merah sebagai berikut :

- 1) Mengambil darah ikan yang telah dicampur dengan anti koagulan di ambil dengan pipet eritrosit sebanyak 0,5 μL .
- 2) Meletakkan darah dalam pipet eritrosit diencerkan dengan larutan hayem dalam pipet eritrosit sampai menunjukkan angka 11 μL .
- 3) Mencampur darah dan dikocok hingga homogen dalam pipet tersebut kemudian campuran tersebut diambil sedikit (20 μL).
- 4) Mengambil darah dari pipet eritrosit dimasukkan dalam kamar hitung improved neubauer dan ditutup dengan cover glass, sebelum memasukkan kedalam improved neubauer terlebih dahulu dibuang 2 tetes dimaksudkan agar larutan yang diambil benar – benar yang telah homogen.
- 5) Mengamati darah menggunakan mikroskop cahaya banyaknya dihitung jumlah eritrosit pada semua kotak eritrosit.

Langkah selanjutnya dilakukan perhitungan Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit), Mikroskop diletakkan pada meja yang datar, lensa kondensor

diturunkan atau diafragma dikecilkan, fokus diatur dahulu dengan memakai lensa obyektif 10X, diatur sehingga gambaran kamar hitung bujur sangkar dengan jelas batasnya serta distribusi sel darah merah tampak jelas. Selanjutnya lensa obyektif di ubah 45X dengan hati – hati dan sel darah merah dihitung pada kotak bujur sangkar kecil (warna merah), sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas haruslah dihitung, sedangkan sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung (Bijanti, 2005). Jumlah eritrosit dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah eritrosit (sel/mm}^3\text{)} &= N \times \frac{1}{5 \text{ area} \times 1/250 \text{ (volume)}} \times 200 \\ \text{(pengenceran)} & \\ &= N \times 10.000 \text{ sel/mm}^3 \quad \text{(Bijanti, 2005)} \end{aligned}$$

c) Pengamatan Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit) (Bijanti, 2005)

Peralatan yang digunakan adalah pipet eritrosit ukuran 11 μL , cover glass, kamar hitung Neubauer, Mikroskop Cahaya, Counter. Bahan yang digunakan adalah sampel darah ikan, Natrium Sitrat 3,8% (anti koagulan) dan larutan turk. Prosedur kerja pengamatan jumlah sel darah putih sebagai berikut :

- 1) Mengambil Darah ikan yang telah tercampur dengan anti koagulan diambil dengan pipet leukosit sebanyak 0,5 μL ,
- 2) Mencampur darah, kemudian diencerkan dengan larutan Turk dalam pipet leukosit sampai menunjukkan angka 11 μL .
- 3) Mencampur darah lalu dikocok hingga homogen dalam pipet tersebut. Kemudian campuran tersebut diambil 2 tetes.
- 4) Mengambil darah dari pipet leukosit dimasukkan ke dalam kamar hitung Haemocytometer dan ditutup dengan cover glass, sebelum memasukkan ke dalam Haemocytometer terlebih dahulu dibuang 2 tetes dimaksudkan agar

larutan yang diambil benar – benar yang telah homogen. Dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x dan dihitung banyaknya jumlah leukosit.

Penghitungan Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit) dengan cara, Mikroskop diletakkan pada meja yang datar, lensa kondensor diturunkan atau diafragma dikecilkan, kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan dibawah lensa obyektif dan fokus mikroskop diarahkan pada garis – garis tersebut. Leukosit dihitung pada keempat bidang besar (kotak warna hijau). Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri. Cara seperti ini dilakukan pada keempat bidang besar. Penghitungan dilakukan dengan catatan sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung (Bijanti, 2005). Jumlah Leukosit dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Leukosit (sel/mm}^3\text{)} &= N \times \frac{1}{4 \text{ area} \times 0,1 \text{ (volume)}} \times 50 \\ \text{(pengenceran)} & \\ &= N \times 125 \text{ sel/mm}^3 \quad \text{(Bijanti, 2005)} \end{aligned}$$

d) Pengamatan Mikronuklei Pada Sel Darah Ikan

Sampel darah perifer diperoleh dari vena caudal dari sampel ikan dan dioleskan pada slide yang bersih. Setelah difiksasi dalam etanol murni selama 20 menit, slide dibiarkan kering udara dan kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Giemsa 10% selama 25 menit. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop Olympus BH2. Lima slide dibuat dari masing – masing ikan 1.000 eritrosit dilakukan skoring dari setiap slide diamati di bawah perbesaran 1000X untuk menentukan frekuensi inti berlekuk, inti lobed, pemula, memecah-belah dan juga sel micronuclei, yang dihitung seperti sel per 1000 (‰) (Guner, 2011).

Diamati tiap sel dan dihitung frekuensi mikronuclei dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Frekuensi Mikronuclei} = \frac{\sum \text{micronuclei} \times (1000)}{\text{Total sel yang dihitung}} \quad (\text{Betancur et al, 2009})$$

3.5.2 Analisis Kualitas Air

a) *Total Suspended Solid (TSS)*

TSS menunjukkan besarnya padatan tersuspensi di dalam air atau limbah. Metode yang digunakan adalah metode Gravimetri. Adapun prosedur pengukuran TSS menurut SNI (2004), adalah sebagai berikut:

- Persiapan kertas saring atau cawan *Gooch*.
 - 1) Meletakkan kertas saring pada peralatan filtrasi. Dipasang vakum dan wadah pencuci dengan air suling berlebih 20 ml.
 - 2) Memindahkan kertas saring dari peralatan filtrasi ke wadah timbang aluminium. Jika menggunakan cawan *Gooch* dapat langsung dikeringkan.
 - 3) Mengeringkan dalam oven pada suhu 103°C sampai dengan 105°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator lalu ditimbang.
- Penyaringan sampel uji
 - 1) Menyaring sampel dengan peralatan vakum. Basahi saringan dengan sedikit air suling
 - 2) Mengaduk sampel uji dengan pengaduk magnetik untuk memperoleh contoh uji yang lebih homogen
 - 3) Mengambil sampel uji dengan volume tertentu, pada waktu contoh diaduk dengan pengaduk magnetik
 - 4) Mencuci kertas saring atau saringan dengan 3 x 10 mL air suling, biarkan kering sempurna, dan lanjutkan penyaringan dengan vakum selama 3 menit agar

diperoleh penyaringan sempurna. Sampel uji dengan padatan terlarut yang tinggi memerlukan pencucian tambahan

- 5) Memindahkan kertas saring secara hati-hati dari peralatan penyaring dan dipindahkan ke wadah timbang aluminium sebagai penyangga. Jika digunakan cawan *Gooch* pindahkan cawan dari rangkaian alatnya.
- 6) Mengeringkan dalam oven setidaknya selama 1 jam pada suhu 103°C sampai dengan 105°C, didinginkan dalam desikator untuk menyeimbangkan suhu dan ditimbang.
- 7) Mengulangi tahapan pengeringan, pendinginan dalam desikator, dan dilakukan penimbangan sampai diperoleh berat konstan atau sampai perubahan berat lebih kecil dari 4% terhadap penimbangan sebelumnya atau lebih kecil dari 0,5 mg.
- 8) Menghitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{TSS (mg/l)} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Vol. air sampel (ml)}}$$

Keterangan :

A : Berat kertas saring berisi residu tersuspensi (mg)

B : Berat kertas saring kosong (mg)

b) Chemical Oxygen Demand (COD) (Hariyadi, 1992)

- 1) Memanaskan sebentar COD reaktor ± 30 menit
- 2) Memasukan sampel 2,5 ml
- 3) Menambahkan DS (digestion solution) 1,5 ml + SA (sulfuric acid) 3,5 ml, kemudian tutup
- 4) Memasukan tabung dalam COD reaktor, panaskan ± 2 jam
- 5) Mengeluarkan lalu dinginkan
- 6) Mengukur dalam spektrofotometer panjang gelombang 600 nm

c) **Biological Oxygen Demand (BOD) (SNI, 2004)**

Mengaerasi larutan pengencer sebanyak 700ml selama lebih kurang 2 jam

- 1) Mengencerkan sampel menggunakan larutan pengencer yang telah diaerasi dengan 10 kali pengenceran
- 2) Memasukkan air sampel ke dalam botol winkler, dan usahakan tidak ada gelembung dalam botol winkler
- 3) Memberi tanda pada masing-masing sampel, yaitu DO 1, DO 2, dan DO 3
- 4) Menyimpan semua sampel dalam inkubator pada suhu 20°C selama 5 hari
- 5) Mengukur DO dengan langkah sebagai berikut :
 - a) Membuka tutup botol winkler
 - b) Menambahkan 2 ml $MnSO_4$, dan pipet harus terendam dibawah permukaan air
 - c) Memasukkan 2 ml larutan Alkali-iodida-azida
 - d) Menutup botol winkler
 - e) Menghomogenkan larutan dengan cara mebolak-balikan botol winkler
 - f) Membiarkan larutan mengendap sampai endapan tersebut memenuhi setengah botol
 - g) Menambahkan 2 ml larutan H_2SO_4 pekat
 - h) Menutup dan menghomogenkan larutan dengan cara membolak-balikan botol winkler
 - i) Mengambil 200 ml air sampel dan dipindahkan ke labu erlenmeyer
 - j) Mentitrasi sampel dengan 0,025 N larutan Na-Thiosulfat sampai didapatkan warna kuning muda
 - k) Menambahkan amilum 1-2 tetes hingga warna berubah menjadi biru
 - l) Mentitrasi sampel dengan 0,025 N larutan Na-Thiosulfat sampai warna biru hilang (tidak berwarna)
 - m) Menghitung nilai DO dengan rumus :

$$DO = \frac{(Vol. Na_2S_2O_3 \times Normalitas Na_2S_2O_3 \times 8000)}{Vol. sampel}$$

6) Menghitung nilai BOD dengan menggunakan rumus :

- BOD inlet = $(DO_0 \text{ inlet} - DO_5 \text{ inlet}) \times \text{pengenceran}$
- BOD outlet = $(DO_0 \text{ outlet} - DO_5 \text{ outlet}) \times \text{pengenceran}$

d) Analisa Logam berat

Untuk analisa sampel cair juga menggunakan metode gravimetry, yaitu dengan prosedur sebagai berikut: sampel cair dimasukkan kedalam beker glas 50 ml, ditambahkan HNO₃ encer 2.5 N sebanyak kurang lebih 10-15 ml, lalu dipanaskan sampai mendidih, kemudian didinginkan, kemudian disaring kelabu takar 50 ml. Kemudian ditambahkan aquads sampai tanda batas, dikocok sampai homogen. Selanjutnya dianalisa kandungan logam berat. Prosedur untuk analisa logam berat seperti pada analisa sampel padat (Rini 2001 *dalam* Arisandi, 2004)

3.6 Roadmap Penelitian Terdahulu

Berdasarkan beberapa penelitian yang dilakukan sebelumnya tentang micronuclei ikan dengan menggunakan beberapa perlakuan bisa dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Penelitian Mikronuklei Sebelumnya :

No	Obyek	Perlakuan	Hasil Penelitian	Sumber
1	<i>Bathygobius soporator</i>	Perlakuan di perairan umum, pengambilan 3 lokasi di Stella mares, Boa viagem, dan Penha	Stella mares frekuensi MN 6,63 ; Boa viagem frekuensi MN 17,47 ; Penha frekuensi MN 15,53	Galindo dan Moreira (2009)
2	<i>P. argentus</i> <i>P. maculatus</i> <i>M. micans</i>	Perlakuan di sungai Francisco pada musim panas	Pada musim panas : <i>P. argentus</i> frekuensi MN 07, ± 0,4 dari 2000 sel ; <i>P. maculatus</i> frekuensi MN 0,1 ±	Seriani <i>et.al</i> (2011)

3	<i>Cypinus carpio</i>	Perlakuan di danau Uluabet Turkey yang terkontaminasi dari limbah pertanian dan limbah domestik	0,04 dari 2000 sel ; <i>M. micas</i> frekuensi MN $0,7 \pm 0,3$ dari 2000 sel Jumlah MN Kontrl sebesar 28 sel : Pada periode 1 jumlah MN ikan Mas yang dari danau sebesar 62 sel ; pada periode 2 jumlah MN ikan Mas dari danau sebesar 68 sel ; pada periode 3 jumlah MN ikan Mas dari danau sebesar 78 sel.	Saleh dan Alsheri (2011)
4	<i>Cyphocharax magdaleanae</i> <i>Prochilodus magdalenae</i> <i>Hoplias malabaricus</i> <i>Pimelodus blochii</i> <i>Caquetaia krausii</i>	Ikan pada perairan umum (Danau Santader) yang dicemari oleh sisa endapan pertambangan em	Pada ikan <i>Cyphocharax magdaleanae</i> frekuensi MN=1,23; S.D= 0,60 Pada ikan <i>Prochilodus magdalenae</i> frekuensi MN= 0,61 ; S.D= 2,12 Pada ikan <i>Hoplias malabaricus</i> frekuensi MN= 2,5 ;S.D= 2,12 Pada ikan <i>Pimelodus blochii</i> frekuensi MN= 0,57; S.D= 0,67 Pada ikan <i>Caquetaia krausii</i> frekuensi MN= 0,46; S.D= 0,63	Betancur <i>at,al</i> (2009)

