

### III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain (Lampiran 1):

- |                                     |                     |                    |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------|
| - Mikroskop                         | - Gelas ukur        | - Objek glass      |
| - Autoclave                         | - Tabung reaksi     | - Pipet mohr       |
| - Botol DO 250 ml                   | - Timbangan digital | - Inkubator        |
| - Botol kaca 2 liter                | - Kompur listrik    | - Lemari pendingin |
| - Buret                             | - Cawan petri       | - Waterbath shaker |
| - Cuvet spektro                     | - Cawan porselen    | - Gelas piala      |
| - Corong                            | - Oven              | - Erlenmeyer       |
| - Jarum ose                         | - Bulp              | - Bunsen           |
| - Spatula                           | - Pipet tetes       | - Cool box         |
| - Spektrofotometer                  | - Pipet ukur        | - Refaktotometer   |
| - Penangas air ( <i>Hot Plate</i> ) | - Sentrifuse        | - DO meter         |
| - pH meter                          | - Klem              |                    |
| - Thermometer                       | - Statif            |                    |
| - Kain lap                          | - Gelas wool        |                    |

##### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut

(Lampiran 1):

- |                                  |                        |
|----------------------------------|------------------------|
| - Sampel (sedimen)               | - Spirtus              |
| - Biakan <i>B.pumilus</i>        | - Na-Thiosulfat 0,025N |
| - Media NB                       | - Aquadest             |
| - Media NA                       | - Alkohol              |
| - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | - Asam Fenoldisufonik  |
| - Na-Oxalat                      | - KI                   |
| - Larutan <i>Nessler</i>         | - NaCl                 |
| - NaOH                           | - Amylum               |
| - MNSO <sub>4</sub>              | - Kertas saring        |
| - Tissue                         | - KMnO <sub>4</sub>    |
|                                  | - Aseton               |
|                                  | - Safranin             |
|                                  | - Kristal violet       |
|                                  | - NH <sub>4</sub> OH   |

### 3.2 Metode Penelitian

Menurut Nazir (2005), metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen yaitu suatu metode yang mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel yang diselediki. Tujuan eksperimen ini adalah untuk menemukan hubungan sebab akibat antar variabel. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian dan selalu menggunakan kontrol.

Eksperimen atau percobaan merupakan tahap pengujian kebenaran hipotesis yang diajukan dalam suatu penelitian eksperimen. Percobaan dapat menentukan berhasil tidaknya pemecahan yang ditawarkan untuk mengatasi permasalahan. Suatu percobaan yang baik memberi peluang peneliti untuk membuktikan kebenaran hipotesisnya sehingga mendapatkan kesimpulan dan rekomendasi hasil yang tepat dan benar sesuai faktanya (Hanafiah, 2008).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Maryanti (2010), Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium.

Menurut Maryanti (2010), model umum untuk RAL adalah sebagai berikut:

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Keterangan :

Y = Nilai pengamatan dari suatu percobaan

$\mu$  = Nilai tengah populasi (rata-rata sesungguhnya)

T = Pengaruh perlakuan

$\epsilon$  = Pengaruh galat dari suatu percobaan

Dalam penelitian ini, sebagai perlakuan adalah kepadatan yang berbeda-beda terhadap degradasi bahan organik dari sedimen tambak udang. Perlakuan dalam penelitian tersebut yaitu:

Perlakuan A : Perlakuan tanpa pemberian bakteri *B. pumilus* (kontrol)

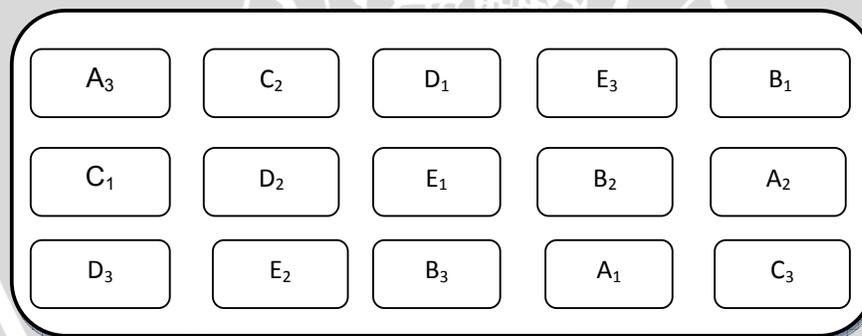
Perlakuan B : Pemberian bakteri *B. pumilus* dengan kepadatan  $10^4$  sel/ml

Perlakuan C : Pemberian bakteri *B. pumilus* dengan kepadatan  $10^5$  sel/ml

Perlakuan D : Pemberian bakteri *B. pumilus* dengan kepadatan  $10^6$  sel/ml

Perlakuan E : Pemberian bakteri *B. pumilus* dengan kepadatan  $10^7$  sel/ml

Dalam perlakuan ini, masing-masing perlakuan diberi ulangan sebanyak 3 kali yang ditempatkan secara acak. Denah percobaan dapat dilihat pada Gambar 4 berikut:



**Gambar 4. Denah Rancangan Penelitian**

Keterangan :

A = Kontrol

B, C, D, E = Perlakuan

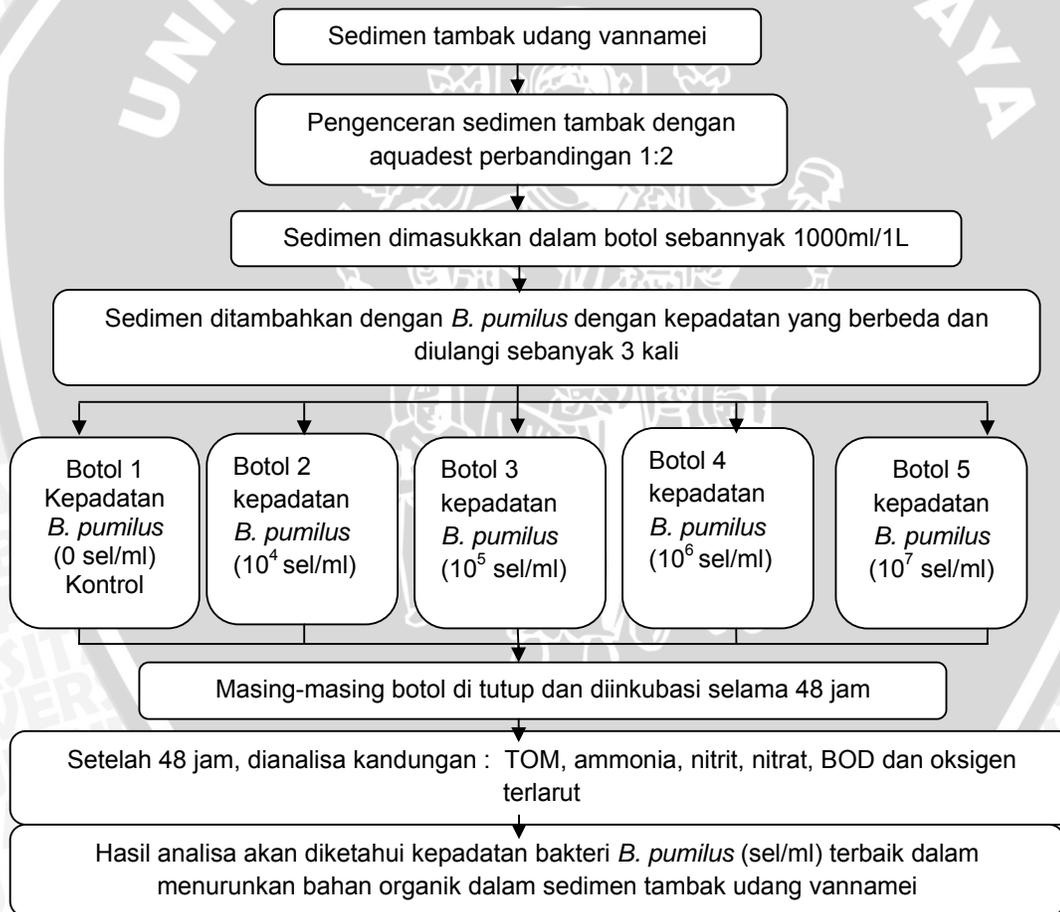
1, 2, 3 = Ulangan

Kisaran kepadatan bakteri *B. pumilus* diperoleh dari penelitian terdahulu yaitu pada bakteri *bacillus spp.* Kepadatan bakteri komersil yang ditambahkan pada air dan dasar tambak berkisar antara  $10^4$  sel/ml sampai dengan  $10^7$  sel/ml

(Gunarto *et. al.*, 2006). Berdasarkan hal tersebut, untuk mengetahui kemampuan bakteri *B. pumilus* dalam mendegradasi sedimen dari tambak udang pada budidaya udang intensif, digunakan kepadatan antara lain kontrol (tanpa pemberian bakteri *B. pumilus*), kepadatan  $10^4$  sel/ml,  $10^5$  sel/ml,  $10^6$  sel/ml dan  $10^7$  sel/ml. Sehingga dengan penelitian ini dapat menjawab permasalahan tersebut.

### 3.4 Alur Kerangka Operasional Penelitian

Adapun alur kerangka operasional penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5 di bawah ini.



Gambar 5. Alur Kerangka Operasional Penelitian

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat

Peralatan yang akan digunakan terlebih dahulu disterilisasi, tujuannya agar tidak terkontaminasi dan akan mempengaruhi hasil kerja laboratorium itu sendiri. Peralatan yang disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas koran, kemudian dibungkus dengan menggunakan karet. Kemudian dituangkan secukupnya air ke dalam autoklaf, alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang.

Autoclave dinyalakan, setelah beberapa saat monometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan maka kran udara dibuka hingga monometer menunjukkan angka 1 atm kembali. Ketika sampai suhu 121°C dan monometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit. Tombol power autoclave dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan. Ditunggu beberapa saat sampai termometer dan monometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu penutup autoklaf dibuka secara silang. Alat yang sudah disterilkan diambil. Alat yang telah disterilkan disimpan dalam inkubator, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.5.2 Pengambilan Sampel

Sampel limbah yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari tambak pembesaran udang vanamei (*Liptonemus vannamei*) yang dibudidayakan secara semi-intensif daerah Tuban, Propinsi Jawa Timur. Sampel diambil dari sedimen bagian dasar perairan dengan cara diambil pada lapisan teratas hingga kedalaman 5 cm. Agus (2008), konsentrasi bahan organik tertinggi di sedimen terdapat pada lapisan teratas hingga kedalaman 5 cm. Umumnya bahan organik

pada lapisan ini masih baru dan peka terhadap dekomposisi cepat oleh mikroorganisme. Kemudian sedimen dimasukkan ke dalam plastik dan diikat lalu disimpan dalam *cool box* agar suhu sampel tetap konstan.

### 3.5.3 Pembuatan Media

Pembuatan media diperlukan bahan dengan komposisi NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*) dapat disajikan pada Lampiran 2.

#### a. Media NA (*Nutrient Agar*)

Media NA (*Nutrient Agar*) ditimbang sebanyak 2,8 gram dilarutkan dengan 100 ml *aquadest*. Untuk menghomogenkan larutan dilakukan pemanasan dan pengadukan di atas kompor listrik hingga mendidih. NA dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 15 - 25 ml secara aseptik, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu media didinginkan dan siap digunakan dapat disajikan pada Lampiran 2 (Pirzada, 2009).

#### b. Media NB (*Nutrient Broth*)

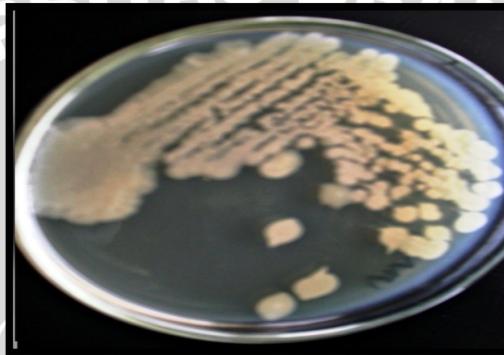
Diambil sebanyak 50 ml media *Nutrient Broth* dengan menggunakan pipet secara aseptik, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit (Lampiran 2). Selanjutnya media didinginkan dan siap digunakan (Pirzada, 2009).

### 3.5.4 Pembuatan Biakan Bakteri *B. pumilus*

*Nutrient agar* (NA) sebanyak 2,8 gram dilarutkan dengan 100 ml *aquadest* kemudian dipanaskan dan diaduk di atas kompor listrik hingga mendidih agar cepat homogen. Larutan NA dituang ke dalam cawan petri sebanyak 25-30 ml serta dilakukan uji sterilisasi yaitu dengan menggunakan media yang sudah mengeras diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Petri disk yang berisi media NA yang telah disterilkan disiapkan terlebih dahulu. Kemudian isolat bakteri yang diambil dari biakan murni *B. pumilus*

digoreskan pada cawan petri menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipanaskan (hingga berpijar) di atas api bunsen. Setelah itu cawan petri ditutup rapat dan dipanaskan di atas bunsen pada bagian tepinya. Media yang telah terisi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Lampiran 3). Kemudian dilakukan Kultur bakteri *B. pumilus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hasil dari kultur bakteri *B. pumilus* dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6. Kultur Bakteri *B. pumilus***

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut diperoleh bahwa *B. pumilus* memiliki bentuk koloni oval dimana pada bagian tepinya tidak rata, berwarna putih susu (krem), berukuran 8-15 mm dan elevansi koloni agak cembung. Sedangkan pada pengamatan mikroskopisnya dilakukan perwarnaan gram dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x.

### **3.5.5 Pewarnaan Gram**

Pewarnaan gram adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi, karena merupakan tahapan penting dalam identifikasi. Bakteri yang sudah ditumbuhkan pada media padat, selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Tahapan pewarnaan gram diawali dengan menyemprot kaca objek dengan alkohol, kemudian lap dengan tissue

dan dibakar pada api bunsen untuk menghilangkan sisa alkohol. Jarum ose dibakar sampai berpijar dan didiamkan sebentar sampai dingin. Biakan bakteri yang berasal dari cawan petri diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek. Selanjutnya dilakukan fiksasi sampel bakteri pada api bunsen dengan jarak 20 cm dari api supaya tidak terlalu panas dan tidak merusak bentuk sel bakteri. Ditambahkan setetes pewarnaan kristal violet dan didiamkan selama 2 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Ditetesi kembali dengan lugol dan didiamkan selama 1 menit. Dibilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir. Diwarnai dengan safranin selama 15 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir. Didiamkan dan dikeringkan untuk selanjutnya dapat diamati pada mikroskop dengan perbesaran 100x dapat disajikan pada Lampiran 4 (Viramedika, 2008).

Hasil pewarnaan gram dapat dilihat bahwa bakteri *B. pumilus* berbentuk batang, berwarna keunguan dan merupakan bakteri gram positif. Menurut Anonymous (2011<sup>a</sup>), *B. pumilus* merupakan kelompok bakteri yang berbentuk batang. Bakteri gram positif akan menunjukkan warna ungu pada saat diberi larutan pewarna kristal ungu, hal ini dikarenakan bakteri tersebut memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal, sehingga menahan warna ungu pada kristal violet selama pewarnaan gram. Sedangkan bakteri gram negatif adalah bakteri yang akan kehilangan ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol dan sewaktu diberi pewarna tandingan dengan warna merah safranin tampak berwarna merah karena memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis sehingga pewarna ungu terbang (Pelcsar dan Chan, 2005).

Pewarnaan bakteri dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti fiksasi, peluntur warna, substrat, intensifikasi pewarnaan dan penggunaan zat warna penutup (Rudi, 2010).

### 3.5.6 Perbanyak Bakteri *B. pumilus* dan Penentuan Jumlah Bakteri dengan Pengenceran

Media NB (*Nutrient Broth*) sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ukuran 250 ml kemudian disterilisasikan pada 121°C selama 15 menit. Bakteri *B. pumilus* yang sudah dibiakkan pada media padat selanjutnya ditumbuhkan pada media cair NB. Bakteri *B. pumilus* pada media padat diambil sebanyak 1 jarum ose dan kemudian dilarutkan dalam media NB sebanyak 100 ml. Setelah itu dilakukan shaking terus menerus pada suhu 37°C selama 24 jam dan dilakukan pengenceran berseri dari kepadatan  $10^7$  sel/ml sampai  $10^4$  sel/ml (Lampiran 5).

### 3.5.7 Penentuan Kepadatan Optimum Bakteri *B. pumilus*

Penentuan kepadatan bakteri yang digunakan untuk mendegradasi bahan organik dari sedimen tambak udang didapatkan dari penelitian pendahuluan. Kepadatan bakteri komersial yang ditambahkan pada air dan dasar tambak berkisar antara  $10^4$  sel/ml sampai dengan  $10^7$  sel/ml (Gunarto *et. al.*, 2006). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nurcahya (2011), digunakan bakteri *B. subtilis* dengan beberapa kepadatan antara lain kontrol (tanpa penambahan bakteri *B. subtilis*), kepadatan  $10^2$  cfu/ml,  $10^4$  cfu/ml,  $10^6$  cfu/ml dan  $10^8$  cfu/ml. Berdasarkan penelitian pendahuluan tersebut, penambahan bakteri dengan kepadatan  $10^6$  cfu/ml memiliki kemampuan degradasi yang paling tinggi. Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, pada *B. pumilus* yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kontrol (tanpa penambahan bakteri *B. pumilus*), kepadatan  $10^4$  sel/ml,  $10^5$  sel/ml,  $10^6$  sel/ml, dan  $10^7$  sel/ml. Berikut ini merupakan tahapan penentuan kepadatan dan pengenceran bakteri menurut Zulfikar (2010), suspense standar *Mc Farland* 0,5 terdiri dari larutan barium klorida dihidrat ( $\text{BaCl}_2$ ) 1ml,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 ml.

Bakteri *B. pumilus* yang telah ditumbuhkan selama 24 jam pada media NB (*Nutrient Broth*) kemudian ditentukan kepadatannya. Bakteri diambil dengan jarum ose dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9 % sebanyak 9 ml. Selanjutnya dibandingkan dengan larutan *Mc Farland* hingga warna keduanya sama. Dengan demikian maka kepadatan bakteri dalam tabung dapat diasumsikan berjumlah  $10^9$  sel/ml.

### 3.5.8 Penanaman Bakteri *B. pumilus*

Penanaman bakteri *B. pumilus* dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri *B. pumilus* secara langsung dalam mendegradasi sedimen tambak udang. Penanaman bakteri *B. pumilus* dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Sampel sedimen tambak udang terlebih dahulu ditimbang menggunakan timbangan digital dan ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:2 lalu diaduk hingga homogen. Menurut Kurniawan (2010), dengan jumlah penambahan bakteri 6 ml per 1000 ml pada sampel limbah mampu mendegradasi bahan organik di perairan. Jumlah bakteri yang digunakan adalah 6 ml dan ditambahkan ke dalam 250 ml sampel sedimen tambak dengan masa inkubasi 48 jam. Menurut Pelczar dan Chan (2005), aktivitas maksimum enzim *Bacillus* adalah 24-48 jam. Penambahan ini dilakukan dengan menggunakan pipet volume dan bunsen, kemudian botol ditutup.

Selama proses inkubasi bakteri *B. pumilus* botol ditutup dengan tujuan pengkondisian dasar tambak yang rendah kandungan oksigennya karena bakteri ini merupakan aerob fakultatif. Selain itu, tujuannya adalah untuk menghindari kontaminan.

Dalam penelitian ini, sedimen tambak yang diambil berasal dari tambak pembesaran udang vannamei dengan masa pemeliharaan 98 hari. Adapun bagian sedimen tambak yang dijadikan sebagai bahan uji berasal dari perairan

bagian dasar tambak. Dalam kegiatan budidaya, sebagian besar pakan yang diberikan tidak dikonsumsi oleh udang di tambak. Akumulasi sisa pakan akan meningkatkan jumlah bahan organik dalam ekosistem perairan. Menurut (Firmansyah, 2011), pencemaran sedimen tambak udang akibat sisa pakan, pemberian bahan kimia, dan antibiotik, pengembangan untuk modifikasi genetika dan penyakit merupakan permasalahan yang menyebabkan hilangnya keanekaragaman hayati, menurunnya kualitas tanah, pencemaran kualitas air serta kontaminasi sedimen tambak pada lingkungan sekitar.

### 3.5.9 Uji Biokimia

Uji biokimia dapat dilakukan untuk mengetahui karakteristik dan identifikasi bakteri. Kebanyakan bakteri aerob dan anaerob fakultatif akan memproduksi hidrogen peroksida yang bersifat toksik terhadap bakteri yang masih hidup. Untuk menjaga kelangsungan hidupnya, sejumlah bakteri mampu menghasilkan enzim katalase yang memecah  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen sehingga sifat toksiknya hilang (Pelczar dan Chan, 2005).

Menurut Wahyu (2010), Uji biokimia untuk identifikasi bakteri melalui tahap-tahap, yaitu uji oksidase, produksi katalase, hidrolisis (protein, asam amino triptofan, pati/karbohidrat, urea), uji sitrat simmons, uji motilitas. Uji biokimia *B. pumilus* meliputi uji motilitas, uji katalase, uji oksidase dll. Uji biokimia dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya sehingga di dapat hasil analisisnya Lampiran 6.

### 3.5.10 Prosedur Pengukuran Kualitas Air

#### 3.5.10.1 TOM (ppm)

- Sampel sedimen ditimbang sebanyak 12,5 ml dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml.
- Ditambahkan 9,5 ml  $KMnO_4$  dari buret.

- Ditambahkan 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:4).
- Sampel dipanaskan dengan suhu 70-80°C, kemudian diangkat.
- Bila suhu telah turun menjadi 60-70°C sampai tidak berwarna, ditambahkan Na-Oxalat 1 ml 0,01 N.
- Dititrasi dengan  $\text{KMnO}_4$  hingga berwarna merah muda. Dicatat volume  $\text{KMnO}_4$  sebagai X ml.
- Kemudian disiapkan 50 ml aquades, dan dilakukan prosedur yang sama dengan perlakuan pada air sampel. Dicatat volume  $\text{KMnO}_4$  yang digunakan sebagai Y ml.
- Kemudian dihitung kadar TOM dengan rumus:

$$\text{TOM (mg/L)} = \frac{(X - Y) \times 3,16 \times 1000 \times 0,01}{V \text{ air sampel}}$$

### 3.5.10.2 Ammonia (ppm)

#### a. Pembuatan Larutan Standart Ammonia

Menurut Wijayanti (2011), pembuatan larutan standart untuk pengukuran ammonia dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 adalah berikut ini:

- Ditambahkan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Ammonium sulphate) sebanyak 1 mg, dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10 mg/l.
- Larutan ammonia 10 mg/l tersebut diencerkan untuk membuat larutan standart sesuai konsentrasi yang diinginkan dapat dilihat pada Tabel 1.

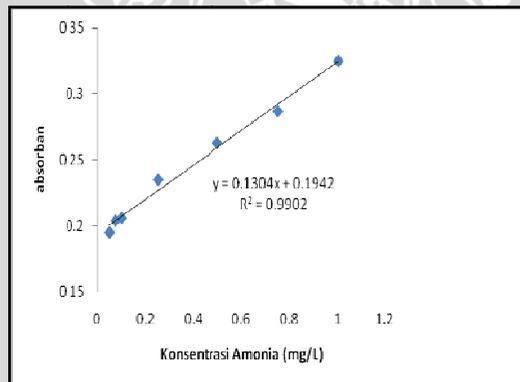
Tabel 1. Pembuatan Larutan Ammonia

Larutan Amonia 10 mg/l (ml)	Pengencer (ml)	Konsentrasi (mg/l)
0,5	100	0,05
0,75	100	0,075
1	100	0,1
2,5	100	0,25
5	100	0,5
7,5	100	0,75
10	100	1

- Larutan standart tersebut dimasukkan ke dalam cuvet dan diukur nilai absorbannya dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 panjang gelombang 425 nm dapat dilihat pada Tabel 2.
- Nilai absorbansi digunakan untuk membuat regresi, dari hasil regresi amonia diperoleh persamaan  $y = 0,1304x + 0,1942$  dapat dilihat pada Gambar 7.

Tabel 2. Konsentrasi Larutan Standar

Konsentrasi (mg/l)	Absorban
0,05	0,195
0,075	0,204
0,1	0,206
0,25	0,235
0,5	0,263
0,75	0,287
1	0,325



Gambar 7. Kurva Standar Ammonia

#### b. Pengukuran Ammonia

- Sampel ditimbang sebanyak 12,5 ml dari tiap-tiap perlakuan.
- Air sampel disaring sebanyak 100 ml dengan menggunakan kertas saring ke dalam *beaker glass*.
- Ditetesi larutan *nessler* sebanyak 1 ml, ditunggu sampai air sampel benar-benar mengendap.

- Dilakukan standarisasi spektrofotometer dengan larutan aseton sebanyak 10 ml. Dengan menekan tombol on (*power*) untuk menghidupkan spektrofotometer. Ditekan program pada kedudukan 380 nm dan panjang gelombang 425 nm.
- Larutan standart dimasukkan, kemudian tekan *zero*. tekan enter.
- Lalu larutan standart diganti dengan air sampel dan tekan enter.
- Kemudian dicatat nilai ammonia (NH<sub>3</sub>) pada spektrofotometer dengan satuan mg/l (ppm).

### 3.5.10.3 Nitrit (ppm)

#### a. Pembuatan Larutan Nitrit

Menurut Wijayanti (2011), pembuatan larutan standart untuk pengukuran nitrit dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 adalah berikut ini:

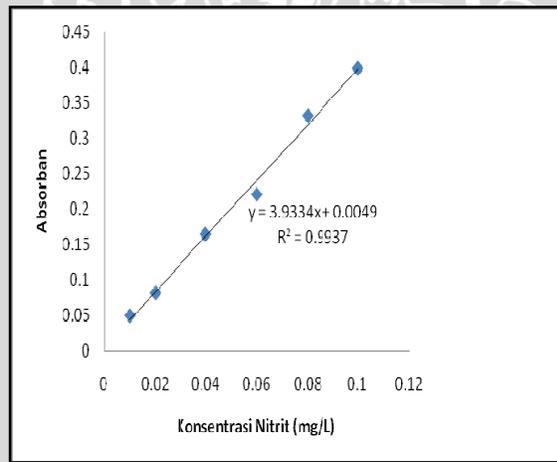
- NaNO<sub>2</sub> (Sodium Nitrit) sebanyak 0,2 mg dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2 mg/l.
- Larutan nitrit 2 mg/l tersebut diencerkan untuk membuat larutan standart sesuai konsentrasi yang diinginkan dapat dilihat pada Tabel 3.
- Larutan standart tersebut dimasukkan ke dalam cuvet dan diukur nilai absorbannya dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 panjang gelombang 543 nm dapat dilihat pada Tabel 4.
- Larutan standart tersebut dimasukkan ke dalam cuvet dan diukur nilai absorbannya dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 panjang gelombang 543 nm.
- Nilai absorban digunakan untuk membuat regresi, dari hasil regresi nitrit diperoleh persamaan  $y = 3,9334x + 0,0049$  dapat dilihat pada Gambar 8.

Tabel 3. Pembuatan Larutan Nitrit

Larutan Nitrit 2 mg/l (ml)	Pengencer (ml)	Konsentrasi (mg/l)
0,5	100	0,01
1	100	0,02
2	100	0,04
3	100	0,06
4	100	0,08
5	100	0,1

Tabel 4. Konsentrasi Larutan Standar

Konsentrasi (mg/l)	Absorban
0,01	0,05
0,02	0,082
0,04	0,165
0,06	0,221
0,08	0,332
0,1	0,399



Gambar 8. Kurva Standart Nitrit

#### b. Pengukuran Nitrit

Metode analisa Nitrit sesuai dengan Hariyadi (2004) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- Air sampel diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 ml.

- Ditambahkan 4 tetes Sulfanilamid, digoyangkan *beaker glass* agar larutan tercampur dan diamkan selama  $\pm 3$  menit.
- Ditambahkan 4 tetes NED dan didiamkan selama  $\pm 10$  menit.
- Sampel dimasukkan ke dalam cuvet kemudian ukur dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 panjang gelombang 543 nm.

### 3.5.10.4 Nitrat (ppm)

#### a. Pembuatan Larutan Standart Nitrat

Menurut Wijayanti (2011), pembuatan larutan standart untuk pengukuran nitrat dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 adalah berikut ini:

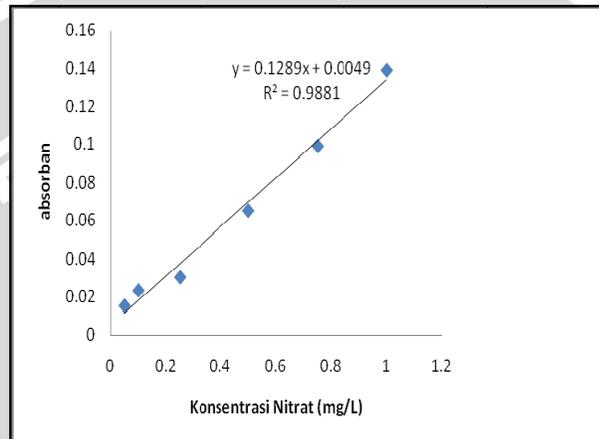
- $\text{NaNO}_3$  (Sodium Nitrat) sebanyak 1 mg dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10 mg/l.
- Larutan nitrat 10 mg/l tersebut diencerkan untuk membuat larutan standart sesuai konsentrasi yang diinginkan dapat dilihat pada Tabel 5.
- Larutan standart tersebut dimasukkan ke dalam cuvet dan diukur nilai absorbannya dengan menggunakan Spektrofotometer Libra S22 panjang gelombang 410 nm dapat dilihat pada Tabel 6.
- Nilai absorban digunakan untuk membuat regresi, dari hasil regresi amonia diperoleh persamaan  $y = 3,9334x + 0,0049$  dapat dilihat pada Gambar 9.

Tabel 5. Pembuatan Larutan Nitrat

Larutan Nitrat 10 mg/l (ml)	Pengencer (ml)	Konsentrasi (mg/l)
0,5	100	0,05
1	100	0,1
2,5	100	0,25
5	100	0,5
7,5	100	0,75
10	100	1

Tabel 6. Konsentrasi Larutan Standar

Konsentrasi (mg/l)	Absorban
0,05	0,015
0,1	0,023
0,25	0,03
0,5	0,065
0,75	0,099
1	0,139



Gambar 9. Kurva Standar Nitrat

### b. Pengukuran Nitrat

Metode analisa Nitrat sesuai dengan Boyd (1979), dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- Air sampel sebanyak 12,5 ml diambil dan dimasukkan ke dalam beaker glass 50 ml.
- Dikerakkan air sampel dengan hot plate dan dinginkan  $\pm$  30 menit.
- Ditambahkan 1 ml asam Fenoldisulfonik ke dalam beaker glass yang telah dikerakkan.
- Ditambahkan aquadest 2 ml kemudian kerak pada beaker glass dikerik dengan spatula.

- Ditambahkan  $\text{NH}_4\text{OH}$  1:1 sampai kerak berubah warna menjadi kuning stabil dan ditambahkan aquadest ke dalam *beaker glass* hingga volume 12,5 ml (volume awal).
- Dimasukkan sampel ke dalam cuvet dan ukur konsentrasi nitrat dengan Spektrofotometer Libra S22 panjang gelombang 410 nm.

### 3.5.10.5 BOD (ppm)

- Disiapkan botol DO, diukur dan dicatat volume botol DO yang akan digunakan.
- Dimasukkan botol DO ke perairan secara perlahan dengan posisi miring dan diusahakan jangan sampai terjadi gelembung udara.
- Ditutup botol DO di dalam air apabila botol telah penuh.
- Dibuka tutup botol DO yang berisi air sampel, ditambahkan 2 ml  $\text{MnSO}_4$  dan 2 ml  $\text{NaOH} + \text{KI}$ .
- Dibolak-balikkan dan dibiarkan hingga  $\pm 30$  menit sampai terjadi endapan coklat.
- Dibuang air yang bening di atas endapan, kemudian endapan yang tersisa diberi 2 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dan dikocok hingga endapan larut.
- Diberi 3-4 tetes amylum, dititrasikan dengan Na-thiosulfat 0,025 N hingga jernih (tidak berwarna pertama kali).
- Dihitung kadar DO air sampel dengan menggunakan rumus:

$$\text{DO (mg/L)} = \frac{V \text{ titran} \times N \text{ titran} \times 1000 \times 8}{V \text{ botol DO} - 4}$$

- Dicatat hasilnya.
- Dihitung BODnya dengan menggunakan rumus :
 
$$\text{BOD} = \text{DO}_1 - \text{DO}_2$$
- Dicatat hasilnya.

### 3.5.10.6 Oksigen Terlarut (ppm)

Menurut Kurniawan (2010) pengukuran oksigen terlarut menggunakan DO meter dengan prosedur :

- *Probe* disambungkan terlebih dahulu sebelum digunakan.
- *Probe* dimasukkan ke dalam *aquadest* untuk kalibrasi.
- *Probe* dimasukkan ke dalam air sampel yang diukur.
- Tombol ON ditekan, ditunggu sampai muncul angka pada layar DO meter.
- Angka yang muncul ditunggu sampai posisi stabil.
- Setelah selesai, ditekan tombol OFF untuk mematikan alat.
- *Probe* dicuci *aquadest* lalu ditutup.

### 3.5.10.7 Suhu (C<sup>0</sup>)

- Dimasukkan *thermometer* ke dalam tiap-tiap botol perlakuan yang sudah berisi air sampel sampai atas skala baca.
- Ditunggu 2-3 menit sampai skala suhu dalam *thermometer* berhenti dan menunjuk pada skala tertentu.
- Kemudian dibaca dan dicatat hasil yang ditunjukkan oleh *thermometer* dalam skala °C.

### 3.5.10.8 pH

Menurut Kurniawan (2010), pH diukur menggunakan pH meter dengan prosedur pengukuran sebagai berikut:

- Elektroda dibersihkan dengan air suling (*aquadest*) sebanyak 3 kali kemudian mengeringkannya dengan *tissue*.

- Elektroda dimasukkan ke dalam tiap-tiap botol sampel yang sudah berisi air sampel selama kurang lebih 1 menit sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap.
- Kemudian derajat keasaman (pH) dapat dilihat langsung dari skala atau digital alat pH meter.
- Dilakukan pengukuran nilai derajat keasaman (pH) pada awal dan akhir perlakuan.

#### 3.5.10.9 Salinitas (ppt)

- Refraktometer dibuka tutupnya.
- Ditetesi dengan *aquadest* 2-3 tetes.
- Dibersihkan dengan tissue searah.
- Ditetesi air sampel  $\pm$  2-3 tetes.
- Refraktometer ditutup dengan sudut  $45^\circ$ .
- Refraktometer diarahkan ke cahaya matahari, dan dilihat skala sebelah kanan refraktometer, dicatat hasilnya.

### 3.6 Parameter Uji

#### 3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran bahan organik dari sedimen tambak udang yang telah diberi perlakuan penambahan *B. pumilus* dengan kepadatan yang berbeda meliputi: TOM, ammonia, nitrit, nitrat, BOD dan Oksigen Terlarut.

### 3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah suhu, pH dan salinitas pada bahan organik dari sedimen tambak. Dimana pengukuran dilakukan sebelum dan sesudah diberi perlakuan.

### 3.6.3 Analisa Data

Analisa data yang digunakan pada penelitian ini yaitu analisa keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%). Kemudian untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi, dilakukan perhitungan analisa regresi yang tujuannya untuk mengetahui sifat dan fungsi regresi yang memberikan keterangan tentang pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon.

