3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah kijing *Anodonta woodiana* yang diambil di bagian inlet, tengah dan outlet dan hemositnya untuk diamati struktur dari hemosit. Selain itu dilakukan pengukuran parameter kualitas air meliputi : suhu, pH, alkalinitas dan oksigen terlarut pada media tempat hidup kijing tersebut.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ini adalah deskriptif yaitu suatu metode yang membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis faktual dan aktual mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungannya antara fenomena yang ada disuatu wilayah tertentu (Faqih, 2001).

3.3 Analisa Data

Analisa data menggunakan Regresi linier sederhana untuk mengetahui hubungan THC dengan kandungan Pb pada perairan dan sedimen. Analisa DHC dilakukan dengan mengamati struktur hemosit pada mikroskop dengan berbagai perbesaran dibandingkan dengan pustaka-pustaka tentang hemosit.

3.4 Tempat Penelitian

Pengambilan kijing dilakukan di kolam UPBAT Punten. Analisa kandungan logam berat Pb di air dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya sedangkan analisa struktur hemosit kijing dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

1. Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan yang dilakukan adalah mengukur kadar Pb pada tubuh kijing taiwan dan kadar Pb di air dari UPBAT Punten pada kolam bagian inlet, tengah dan outlet.

2. Penelitian utama

Penelitian utama ini terdiri dari beberapa tahap yaitu :

a. Pengambilan kijing taiwan

Kijing taiwan diambil dari kolam ikan di UPBAT Punten. Kijing taiwan yang dipilih memiliki kriteria :

1. Kijing taiwan yang masih hidup.
2. Mempunyai ukuran yang tidak berbeda yaitu panjangnya sekitar 8 cm. Berdasarkan penelitian Permata (2011), ukuran kijing yang baik untuk menyerap bahan organik adalah ukuran 8 cm. Kijing yang digunakan dari kolam bagian inlet, tengah dan outlet dengan asumsi kadar Pb yang diperoleh berbeda dari tiga bagian kolam tersebut.
3. Kijing dibersihkan dari lumpur. Kijing tidak langsung diambil hemositnya sehingga di letakkan ke dalam bak yang berisi air kolam asalnya. Keesokan harinya hemositnya diambil. Menurut Wulandari (2010), Haemolymph diambil menggunakan spluit berukuran 1mL dan jarum berukuran 25-G pada bagian pallial sinus tiram. Sebelumnya syringe plastik yang berukuran 1 mL diisi dengan PBS (Phosphate-Buffered Saline) sebanyak 100 µL sebagai antikoagulan untuk menghindari penggumpalan hemosit. Kemudian diambil hemositnya sebanyak 100 µL, dicampurkan kemudian dipindahkan ke eppendorf lalu disimpan dalam coolbox.

b. Mengukur parameter kualitas air

Parameter kualitas air yang diukur adalah suhu, pH, alkalinitas dan oksigen terlarut atau *Dissolved Oxygen (DO).*

c. Menganalisa struktur hemosit kijing taiwan

Analisa struktur hemosit kijing taiwan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Brawijaya.

Karakteristik hemosit yang diamati adalah *Total Haemocyte Count* (THC) untuk mengetahui jumlah hemosit dalam tubuhnya, *Differential Haemocyte Count (DHC)* untuk mengetahui jumlah dan jenis sel darah yang terdapat dalam tubuhnya.

1. Total haemocyte count

Pengambilan hemosit kijing menurut Wulandari (2010), Haemolymph diambil menggunakan spluit berukuran 1mL dan jarum berukuran 25-G pada bagian pallial sinus tiram. Sebelumnya syringe plastik yang berukuran 1 mL diisi dengan PBS (Phosphate-Buffered Saline) sebanyak 100 µL sebagai antikoagulan untuk menghindari penggumpalan hemosit. Kemudian diambil hemosit sebanyak 100 µL, dicampurkan kemudian dipindahkan ke eppendorf lalu disimpan dalam coolbox. Kemudian diambil 100 µL campuran hemosit dan PBS lalu ditambahkan 900 µL Natt-Herrick sebagai larutan pewarna dan didiamkan selama 10 menit. Setelah 5 menit berlalu diambil sedikitnya 20 µL kemudian diletakkan pada slide haemocytometer dan diamati di bawah mikroskop. Kemudian dihitung Total Haemocyte Count dengan formula :

$$\text{THCs} = \frac{\textit{Total Number of cell}}{\textit{Number of square counted}} \times \textit{dillution} \times 10^4 \quad \textit{cell/ml}$$

2. Differential haemocyte count

Hemosit diambil kira-kira 25 µL, kemudian diwarnai terlebih dahulu dengan metode giemsa (Van de Braak, 1996). Menurut Bijanti (2005) *dalam* Wulandari (2010), langkah-langkah pewarnaan giemsa adalah dengan menaruh preparat yang akan dipulas diatas rak tempat memulas dengan lapisan hemolimph menghadap ke atas, lalu diteteskan sekian banyak metilalkohol keatas sediaan tersebut, sehingga lapisan hemolimph tertutup seluruhnya. Dibiarkan selama 2 menit atau lebih, setelah itu selesai dilakukan, dituang kelebihan metilalkohol diatas sediaan tersebut dan dituangkan larutan giemsa yang sudah diencerkan dengan larutan penyangga diatas hapusan hemolimph secara merata, kemudian dibiarkan selama 30 menit. Jika selesai melakukan hal tersebut, langkah berikutnya adalah membilas preparat hapusan hemolimfa tersebut dengan air mengalir lalu preparat ditaruh dalam posisi vertikal dan dibiarkan mengering pada udara.

Setelah pewarnaan hemosit selesai, dilanjutkan dengan pengamatan jumlah sel dalam persentase berdasarkan kriteria dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400X (Aladaileh, *et al.,* 2007 *dalam* Wulandari, 2010).

3.6 Analisa Logam Pb

3.6.1 Analisa Pb pada daging kijing

Menurut Departemen Pekerjaan Umum, 1990 *dalam* Widiati, 2010, metode analisis logam Pb pada sampel padat (daging kijing taiwan)sebagai berikut:

- Menimbang masing-masing sampel padat ± 15 gr dengan timbangan sartorius untuk mendapatkan berat basah.
- Mengoven sampel padat pada suhu ± 105 ^{0}C selam 3-5 jam sampai mendapat berat konstan.

- Menimbang berat konstan dengan timbangan sartorius sebagai berat kering.
- Memasukkan sampel yang sudah kering ke dalam *beaker glass* 100 ml.
- Menambahkan HNO_3 dengan perbandingan 1:1 (HNO_3:HCL) sebanyak ± 10-15 ml.
- Memanaskan diatas *hot plate* di dalam kamar asam sampai larutan tersisa ± 3 ml.
- Menyaring dengan kertas saring ke dalam labu ukur 50 ml.
- Mengulang proses penyaringan sampai tanda batas labu ukur dengan terlebih dahulu menambahkan 15 ml aquades ke dalam *beaker glass*. tempat sampel.
- Menganalisis sampel dengan menggunakan mesin *Atomic Absorbtion Spectophotometer* (AAS) pada panjang gelombang 283,3 nm.
- Menyiapkan larutan standar.
- Menganalisis larutan standar dengan mesin AAS dan mencatat nilai absorbannya kemudian membuat kurva kalibrasinya. Larutan standar ini berfungsi untuk membantu nilai konsentrasi logam Pb pada sampel, karena prinsip kerja mesin AAS hanya menentukan nilai absorbansi dengan sampel.

3.6.2 Analisa Pb pada air

Menurut Busset *et,al* (1994), metode analisis logam timbel (Pb) pada sampel padat (sedimen) sebagai berikut:

- Menimbang masing-masing sampel padat ± 2 gr ke dalam cawan porselen
- Memanaskan di dalam tanur pada suhu ± 700 ^{o}C selama 1 jam
- Menambahkan 5 ml larutan aquaregia
- Memanaskan di atas kompor sampai asat
- Menambahkan 10 ml HNO_3 2,5 N
- Memanaskan secara perlahan-lahan selama 5 menit, lalu melakukan penyaringan ke labu 50 ml

- Menambahkan aquades sampai tanda batas kocok
- Membaca dengan metode AAS (*Atomic Absrobtion Spectrophotometer*) dengan memakai (lampu katoda Pb)
- Mencatat hasil yang diperoleh.

3.6.3 Analisa Pb pada sedimen

Metode analisis timbel (Pb) pada sampel cair (air sampel) menurut Busset *et al,* (1994) adalah sebagai berikut:

- Mengambil contoh air dengan menggunakan pipet volume 50 ml.
- Memasukkan sampel cair ke dalam *erlenmenyer* 100 ml.
- Menambahkan 5 ml aquaregia.
- Memanaskan di atas kompor listrik sampai asat.
- Menambahkan 10 ml HNO_3 2,5 N sebanyak ± 10 – 15 ml.
- Memanaskan sampai mendidih dan mendinginkannya.
- Melakukan penyaringan sampel tersebut ke dalam labu ukur 50 ml.
- Menambahkan aquades sampai tanda batas dan mongocoknya sampai homogen.
- Menganalisis dengan menggunakan mesin AAS (*Atomic Absrobtion Spectrophotometer*) dengan panjang gelombang 283,3 nm dan mencatat absorbansinya. Prinsip perhitungan dan pembuatan larutan standar sama dengan sampel padat.

3.7 Analisa Kualitas Air Pendukung

3.7.1 Suhu

Alat yang digunakan adalah Thermometer Hg. Menurut Fpik-UB (2008), prosedur pengukuran suhu sebagai berikut :

- Memasukkan thermometer Hg ke dalam perairan sekitar 2 menit hingga thermometer berhenti pada skala tertentu.
- Mencatat skala dalam ^{o}C. Pembacaan dilakukan pada saat thermometer masih di dalam perairan dan jangan sampai tersentuh tangan.

3.7.2 pH

Alat yang digunakan adalah pH meter. Menurut Fpik-UB (2010), prosedur pengukuran pH sebagai berikut :

- Menghidupkan pH meter
- Memasukkan pH meter ke dalam air sampel selama 2 menit
- Membaca nilai yang muncul pada pH meter
- Mencatat nilai yang muncul pada pH meter

3.7.3 Alkalinitas

Prosedur pengukuran alkalinitas adalah sebagai berikut:

- Pipet 50 ml air sample kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml
- Cek pH air sample
- Bila pH > 8,5 , titrasi dengan larutan HCl 0,02 N dengan menggunakan indikator PP sampai warna merah muda tepat hilang. Kemudian tambahkan 2 tetes indikator MO (*Methyl Orange*) dan titrasi dilanjutkan sampai terbentuk warna merah muda pertama kali.
- Bila pH < 8,5, titrasi dengan larutan HCl 0,02 N dengan menggunakan indikator MO sampai tepat terjadi perubahan warna.

– Hitung volum HCl 0,02 N yang digunakan dengan rumus:

– $\mathrm{CaCo3}\left(\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{l}}\right) = \frac{v\,(HCl)\,x\,N\,(HCl)}{ml\ air\ sample} + \frac{100}{2}\,x\,1000$

3.7.4 Oksigen terlarut atau *dissolved oxygen* (DO)

Alat yang digunakan adalah DO meter tipe DO 110. Menurut buku petunjuk pemakaian DO meter, prosedur pengukuran DO adalah:

- Membilas probe dengan deionoised atau air suling sebelum digunakan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada ujung probe. Jika tidak ada, rendamlah pada air kran selama 30 menit.
- Menyalakan DO meter. Nilai DO terletak pada bagian atas layar sedangkan indikator suhu terletak pada bagian pojok kanan bawah dari layar.
- Menyelupkan probenya pada sampel dan biarkan beberapa saat sampai stabil.

  Catatan: ketika mencelupkan probe pada sampel, yakinkan bahwa ujung probenya tercelup semua. Yakinkan jangan sampai ada gelembung karena dapat menyebabkan kesalahan dalam pembacaan.
- Membaca nilai DO ketika DO meter sudah stabil. Akan muncul kata " *READY*", dan sampel sudah bisa dibaca nilainya.
- Menekan tombol *" HOLD"* untuk mengunci nilai DO yang terbaca. Tekan *"HOLD"* lagi untuk melepaskan kuncinya.