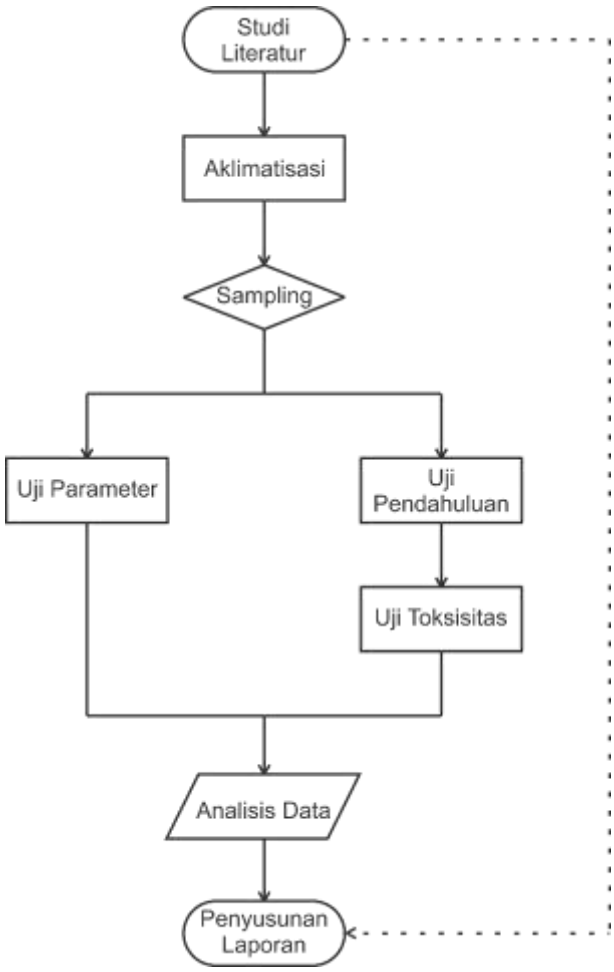
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yang dilakukan secara sistematis. Tahapan tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Kerangka Acuan

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dari studi ini dilakukan di PT. X yang berlokasi didesa Banyakan, Kecamatan Sitimulyo, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Sedangkan lokasi dari analisa dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Kuliatas Air Program Studi Teknik Lingkungan, Universitas Islam Indonesia, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Waktu studi dilakukan pada bulan Februari – Maret tahun 2018, dan waktu analisa dilakukan pada bulan Maret – September tahun 2018.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada pengujian yaitu gelas ukur 1000 ml, gelas ukur 50 ml, pipet tetes, pH meter, termometer, DO meter, cawan petri, sendok, kaca pembesar, lampu penerangan, pipet volume 10 ml, spestrofotometer, timbangan analitik, labu erlenmeyer, desikator, oven, pengaduk magnetik, penjepit, kaca arloji, pompa vacum, cawan *gooch*, botol DO, *water cooler*, labu ukur, *shaker*, blender, SSA, lampu *hollow* katoda Cr, gelas piala 250 ml, corong gelas, pemanas listrik, labu semprot.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada pengujian yaitu aquades, sampel limbah penyamakan kulit, air aerasi, kertas saring, larutan nutrisi, NaH_2PO_4, $Mg_2(PO_4)_2$, $CaCl_2$, larutan feri klorida, larutan suspense bibit mikroba, larutan air pengencer, larutan glukosa-asam glutamat, larutan asam basa 1N, H_2SO_4, NaOH, Na_2SO_3, inhibitor nitrifikasi allythiourea, CH_3COOH, KI 10%, larutan indikator amilum (kanji), HNO_3, larutan standar Cr, gas asetilen.

3.4 Studi Literatur

Studi literatur pada penelitian ini dilakukan dari bulan Januari – Agustus tahun 2018. Studi literatur ini mengumpulkan data – data yang diperlukan pada saat penelitian melalui wawancara, jurnal, buku dan informasi dari perusahaan langsung.

Data – data yang dikumpulkan meliputi informasi umum perusahaan, informasi tentang Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) pada perusahaan tersebut, metode yang digunakan saat analisa, hewan uji yang cocok digunakan terkait penelitian ini, informasi terkait regulasi pemerintah, dan lain – lain.

3.5 Aklimatisasi

Aklimatisasi adalah proses penyesuaian atau adaptasi *Daphnia* sp terhadap lingkungan baru selama 1 – 3 hari. Apabila dalam 24 jam populasi hewan uji mati lebih dari 10 %, maka populasi hewan uji dianggap tidak memenuhi syarat untuk pengujian. Selama aklimatisasi perlu dilakukan proses aerasi, hawan uji juga harus diberi pakan Fermipan selama 2 hari sekali sebanyak 3 mg dan diencerkan sebanyak 2 ml (Fleming, 2004). Volume yang digunakan untuk aklimatisasi sebanyak 1 – 3 liter dengan suhu 25°C, ph sebesar 6 – 8, dan DO lebih dari 3,5 ppm (EPA, 2002).

3.6 Sampling

Sampling air limbah mengacu pada Standar Nasional Indonesia (SNI 6989.59.2008) tentang Air dan Air Limbah, Bagian 59: Metode Pengambilan Contoh Air Limbah. Sampling air limbah dilakukan pada 4 titik yaitu *inlet* kromium, *inlet* limbah cair, kolam penggabungan limbah kromium dengan limbah cair lainnya (kolam *mixing*), dan pada *outlet* IPAL. Pengambilan contoh uji dengan gayung bertangkai panjang, dan wadah yang digunakan untuk penyimpanan contoh uji berupa drum berukuran 25 liter dengan bahan *poli etilen* (PE) dan penyimpanan dengan suhu 4°C selama 6 hari.

3.7 Uji Parameter

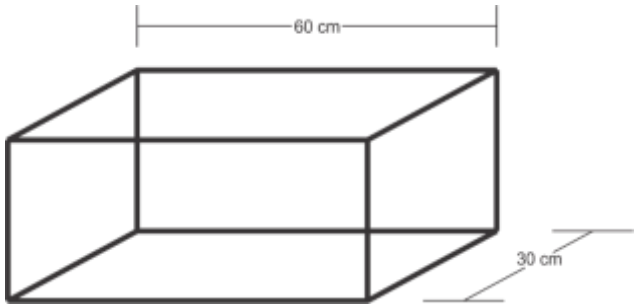
Uji parameter dilakukan dengan mengacu pada Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 5 Tahun 2014 tentang Baku Muku Air Limbah. Parameter yang akan diuji tersaji pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Parameter Uji Air Limbah

Parameter	Satuan	Metode	Acuan
pH	-	pH-meter	SNI 06-6989.11-2004
BOD_5	mg/L	Titrasi secara Iodometri (Modifikasi Azida)	SNI 6989.72-2009
COD	mg/L	Refluks Terbuka secara Titrimetri	SNI 06-6989.15-2004
TSS	mg/L	Gravimetri	SNI 06-6989.3-2004
Kromium	mg/L	Spektrofotometri Serapan Atom (SSA)	SNI 06-6989.17-2004
Temperatur	^oC	Termometer	SNI 06-6989.23-2005
DO	mg/L	Titrasi secara Yodometri (Modifikasi Azida)	SNI 06-6989.14-2004
Sulfida	mg/L	Spektofotometer Uv-Vis	SNI 6989.70-2009
Amonia Total (NH3)	mg/L	Spektrofotometer Uv-Vis	SNI 06-6989.30-2005
Minyak dan Lemak Total	mg/L	Gravimetri	SNI 6989.10-2011
Nitrogen Total	mg/L	Makro Kjedhal secara Spektrofotometri	SK SNI M-47-1990-03

3.8 Reaktor Uji

Reaktor uji yang digunakan pada proses aklimatisasi berbentuk persegi panjang dengan ukuran 60 x 30 cm dengan tebal dinding sekitar 2 cm. Pada saat aklimatisasi tidak menggunakan aerator karena air yang digunakan pada saat aklimatisasi sebelumnya sudah dilakukan proses aerasi selama 24 jam.



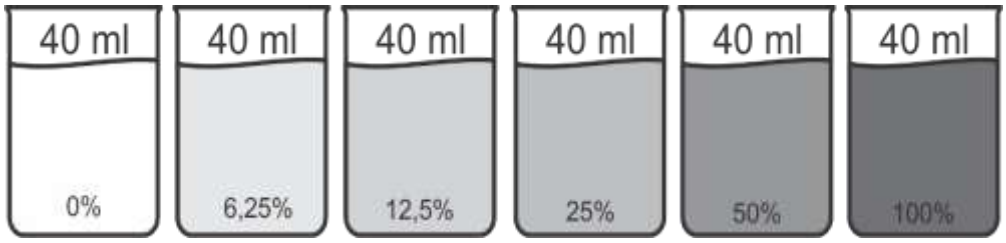
Gambar 3.2 Reaktor Aklimatisasi

Reaktor yang digunakan untuk uji toksisitas yaitu menggunakan gelas ukur 50 ml dan menggunakan 5 – 10 ekor *Daphnia* sp. Volume larutan uji minimal 25 ml pada setiap reaktor (EPA, 2002).

3.9 Uji Toksisitas dengan Metode *Whole Effluent Toxicity*

3.9.1 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat saat pengujian toksisitas, yaitu untuk memperoleh konsentrasi ambang bawah (LC 0-24 jam) yaitu konsentrasi tertinggi dimana hewan uji tidak mengalami kematian dalam waktu jedah 24 jam, dan konsentrasi ambang atas (LC 100-24 jam) yaitu konsentrasi terendah yang menyebabkan mortalitas 100% dalam waktu jedah 24 jam. Setelah *Daphnia* sp melalui proses aklimatisasi, *Daphnia* sp kemudian dipindahkan ke reaktor toksisitas dengan konsentrasi limbah penyamakan kulit bervariasi, diantaranya 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100% 2 jenis limbah berasal dari IPAL.



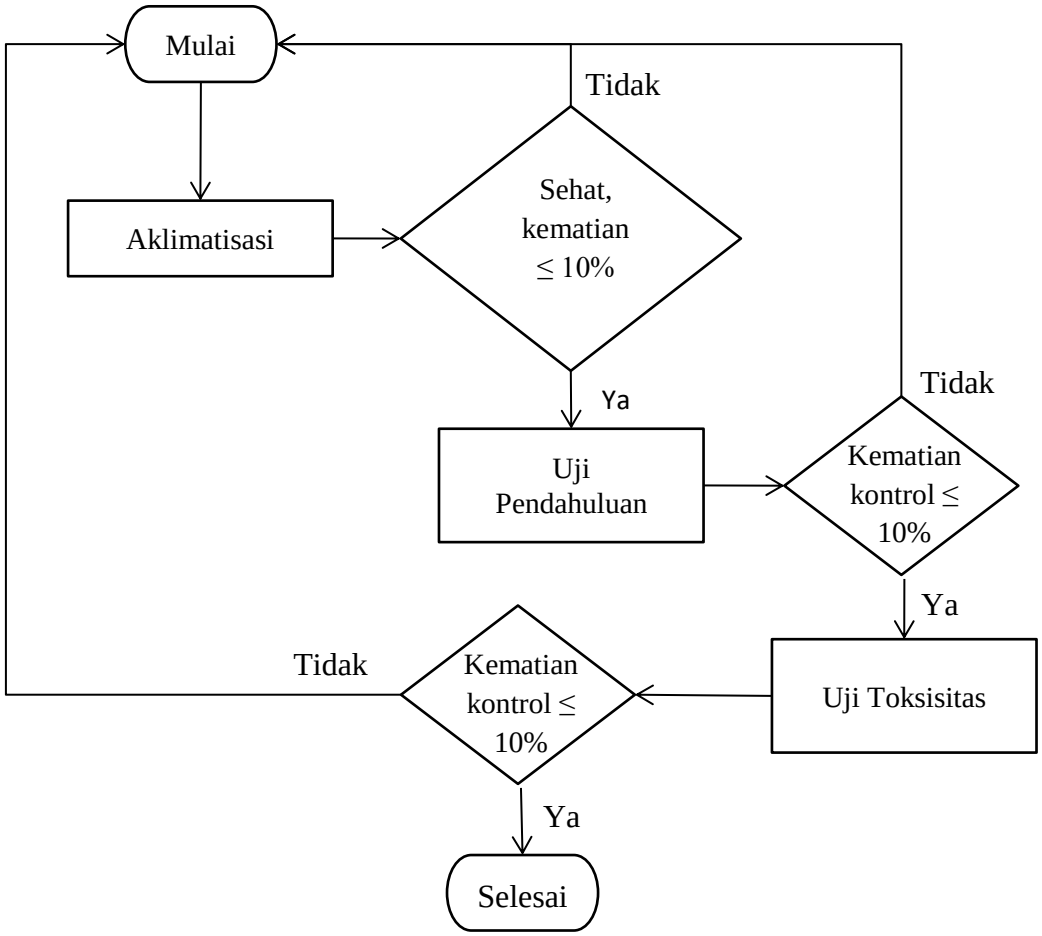
Gambar 3.3 Reaktor Uji Pendahuluan dan Uji Toksisitas

Dilakukan juga pengujian pada konsentrasi 0% sebagai konsentrasi kontrol (Fleming, 2004). Hasil uji dapat diterima atau dikatakan berhasil jika 80% atau lebih,

hewan uji pada control atau konsentrasi 0% di akhir pengujian masih hidup. Apabila yang bertahan hidup lebih kecil dari 80% maka pengujian harus diulang (EPA, 2002).

3.9.2 Uji Toksisitas

Hewan uji yang digunakan untuk uji toksisitas berumur kurang dari 24 jam dan jumlah hewan yang gunakan 5 - 10 ekor (Fabatina, 2013). Pengujian dilakukan dengan melihat hasil dari uji pendahuluan, yang dimana konsentrasi yang menyebabkan kematian 100% pada hewan uji dapat dijadikan konsentrasi tertinggi untuk uji toksisitas. Faktor pengenceran untuk konsentrasi yang digunakan uji toksisitas yaitu sebesar 0,5.



Gambar 3.4 Alur Uji Toksisitas

Pengamatan meliputi perilaku dan kematian hewan uji dilakukan pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, dan 96 jam serta pengukuran kualitas air pada 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 96 jam berupa pH, suhu, dan DO. Hewan uji yang telah mati segera diamati perubahan kondisi tubuh dan dibuang tanpa pergantian hewan uji. Hasil uji dapat diterima atau dikatakan berhasil jika 80% atau lebih, hewan uji pada control atau konsentrasi 0% diakhir pengujian toksisitas masih hidup. Apabila yang bertahan hidup lebih kecil dari 80% maka pengujian harus diulang (EPA, 2002).

3.10 Analisis Data

Metode yang digunakan adalah *Whole Effluent Toxicity* (WET), konsep metode ini mengenalisa tingkatan toksisitas pada suatu limbah. Analisis data yang dilakukan dengan menganalisis hasil dari uji toksisitas yang sudah dilakukan.

Pengolahan data yang diperlukan sebanyak tiga, yaitu :

1. Pembuatan grafik konsentrasi-respon

   Grafik konsentrasi-respon berisi tentang hubungan antara konsentrasi suatu limbah dengan persentase kematian hewan uji pada waktu 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 96 jam.

2. Perhitungan nilai LC_{50}

   Perhitungan nilai LC_{50} terdapat beberapa cara yaitu menggunakan Metode *Grafis*, *Probit*, *Spearmen-Karber*, dan *Trimed Spearmen-Karber*. Penggunaan Metode Perhitungan LC_{50} harus menyesuaikan dengan hasil dari uji toksisitas yang dilakukan (EPA, 2002).

3. *Toxic Unit* (TU)

   Toxic Unit (TU) merupakan ukuran atau nilai toksisitas pada suatu zat kimia atau limbah sebagai penentu satuan Toksisitas Akut (TUa) atau Toksisitas Kronis (TUc). Semakin besar nilai TU, maka semakin besar juga tingkat toksisistasnya. Berikut ini adalah rumus untuk mencari nilai TU :

$$TUa = 100/ LC_{50} \quad \text{(EPA, 2010)}$$

Keterangan :

TUa = *Toxic Unit Acute*

LC50 = Nilai LC_{50}

(EPA, 2010)

Tabel 3.2 Klasifikasi Tingkat Toksisitas Berdasarkan Nilai *Toxicity Unit Acute*

No	Kelas	Tingkat Toksisitas	*Toxic Unit*	*Test Score*
1	Class I	No Acute Toxicity	<1	1
2	Class II	Significant Acute Toxicity	1-10	2
3	Class III	Hight Acute Toxicity	10-100	3
4	Class IV	Very Acute Toxicity	>100	4

Sumber : Vaajasaari, 2005

Menurut (Putra, 2017), konsentrasi dari limbah cair industri penyamakan kulit berpengaruh pada tingkat toksisitas. Semakin tinggi nilai konsentrasi dari limbah cair tersebut, maka akan semakin tinggi tingkat toksisitasnya. Hal itu dibuktikan bahwa semakin tinggi nilai konsentrasi dari limbah cair yang diberikan pada saat pengujian dapat menyebabkan tingginya persentase kematian hewan uji dan sebaliknya.