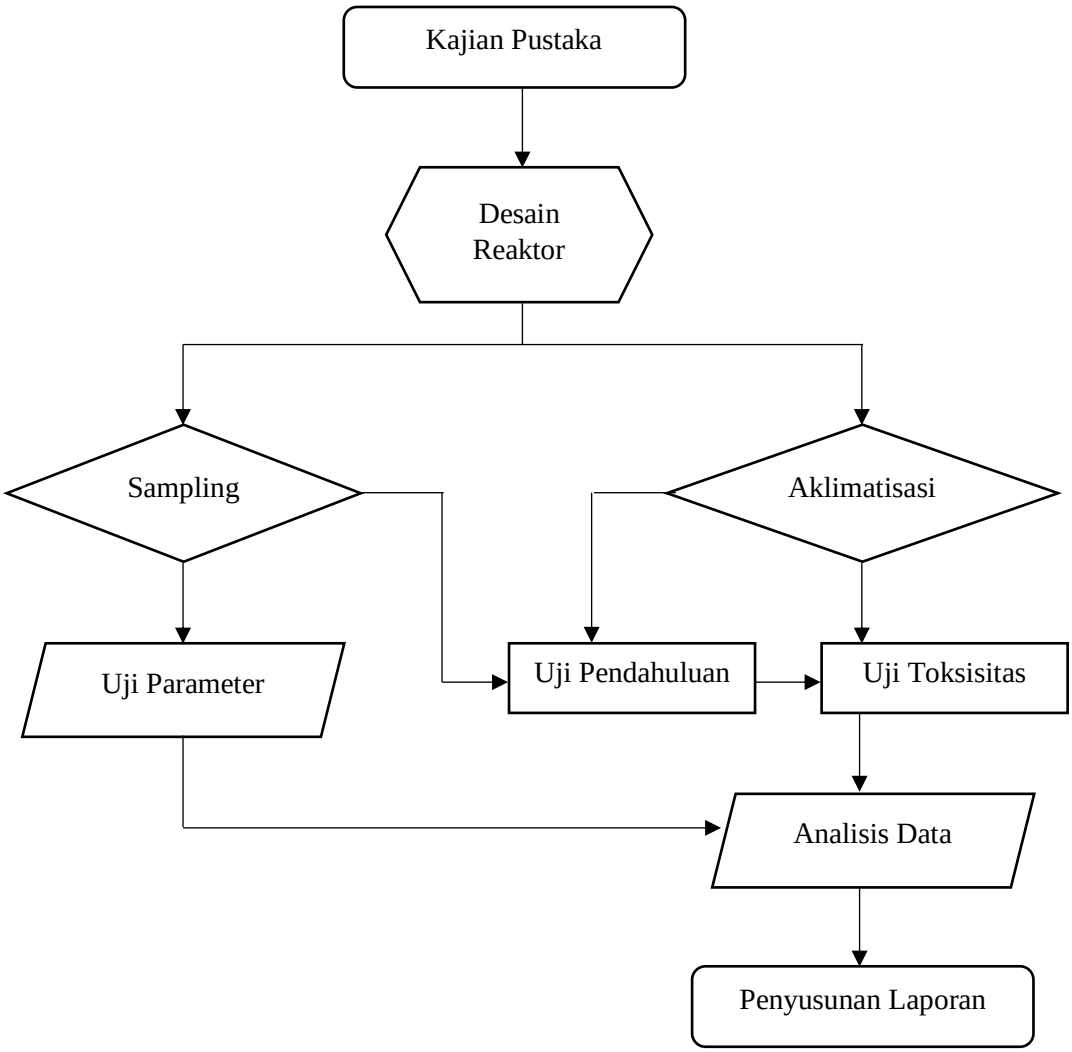
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Diagram Alir

Metode penelitian disajikan pada gambar 3.1 berikut ini:



Gambar 3. 1. Diagram Alir Penelitian

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan kajian pustaka. Kajian pustaka ini terkait dengan referensi terkait topik penelitian dan juga pengumpulan data sekunder. Data sekunder yang diambil berasal dari pengurus IPL TPST Piyungan mengenai kualitas air lindi di titik influen dan efluen pada akhir tahun 2017. Untuk tahap penelitian lainnya akan dijelaskan pada sub-bab selanjutnya.

3.2. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

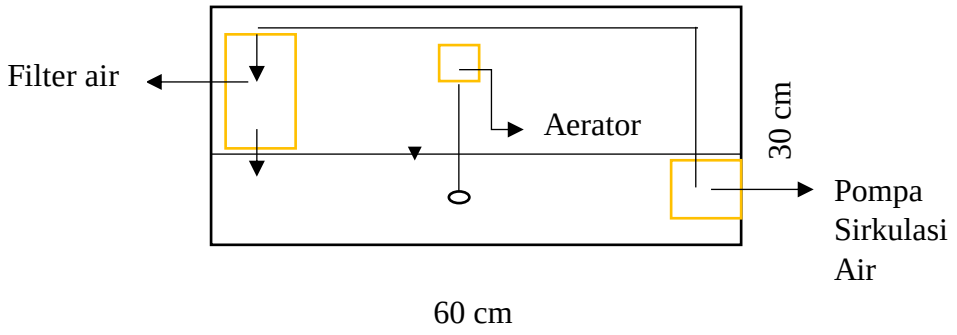
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Kualitas Air Program Studi Teknik Lingkungan Universitas Islam Indonesia, Jalan Kaliurang km 14,5, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta Kode Pos 55584 dan pengambilan sampel di IPL TPST Piyungan, Bantul, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2018 hingga Juni 2018.

Gambar 3. 2. Lokasi Pengambilan Sampel

(sumber : *google earth*)

3.3. Desain Reaktor

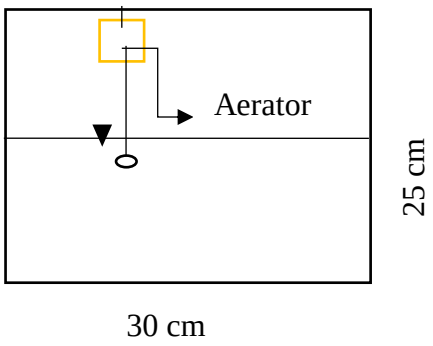
Bahan yang digunakan sebagai reaktor terbuat dari bahan kaca. Standar ukuran untuk reaktor adalah minimum 5 L dan mampu melindungi ikan agar tidak keluar dari reaktor (US EPA, 2002). Reaktor yang digunakan untuk penelitian ini ada 2 jenis yaitu yang pertama untuk aklimatisasi ikan dan yang kedua untuk uji toksisitas. Untuk desain reaktor aklimatisasi dibuat dengan ukuran 60 cm x 30 cm x 30 cm dengan ketebalan kaca 5 mm. Reaktor aklimatisasi menggunakan pompa filter air untuk sirkulasi air pada akuarium yang dilengkapi dengan media filter untuk menahan kotoran ikan agar air tidak menjadi keruh. Selain itu, ditambahkan aerator untuk membantu menyediakan kebutuhan oksigen ikan. Kaca borosilikat atau plastik non toksik harus digunakan sebisa mungkin untuk meminimalkan serapan dan pelepasan bahan beracun, dan dapat digunakan kembali setelah dibersihkan (US EPA, 2002).



Gambar 3. 3. Reaktor Aklimatisasi

Untuk desain reaktor uji toksisitas berukuran 30 cm x 25 cm x 30 cm dengan ketebalan kaca 5 mm. Reaktor ini dilengkapi dengan aerator yang berfungsi untuk menyediakan kebutuh osigen pada ikan. Pada uji toksisitas ini wadah minimal berukuran 5 liter (US EPA, 2002). Reaktor ini digunakan pada tahap uji pendahuluan dan toksisitas influen dan efluen IPL TPST Piyungan. Setaip sampel

menggunakan 5 konsentrasi berbeda dan 1 kontrol. Oleh sebab itu, jumlah reaktor yang digunakan berjumlah 12 buah.



Gambar 3. 4. Reaktor Perlakuan

3.4. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini digunakan pada tahap uji parameter yaitu BOD, COD, TSS, Nitrogen Total dan Kadmium sesuai dengan parameter lindi yang ada pada Peraturan Menteri Lingkungan Hidup No 59 Tahun 2016 tentang Baku Mutu Lindi Bagi Usaha Dan/Atau Kegiatan Tempat Pemrosesan Akhir Sampah . Selain itu, digunakan juga untuk aklimatisasi, uji pendahuluan dan uji toksisitas. Adapun alat tersebut yaitu aerator, reaktor berukuran 60 cm x 30 cm x 30 cm dan berukuran 30 cm x 25 cm x 30 cm, *beaker glass* 1000 ml, *beaker glass* 100 ml, labu *erlenmeyer*, labu ukur, botol *winkler*, buret, corong, oven, cawan porselen, penjepit, kaca arloji, pompa vacum, pipet ukur, pipet volume, pH meter, DO meter, spidol, botol sampel, ember, jerigen, termometer, timbangan analitik, sendok sungu/sendok tanduk, cawan petri , spektrofotometer , kertas saring, kuvet, dan kertas label.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini digunakan untuk uji parameter BOD, COD, TSS, N Total dan Kadmium yaitu air lindi dari influen dan efluen IPL TPST Piyungan, larutan pencerna, larutan pereaksi asam sulfat, asam

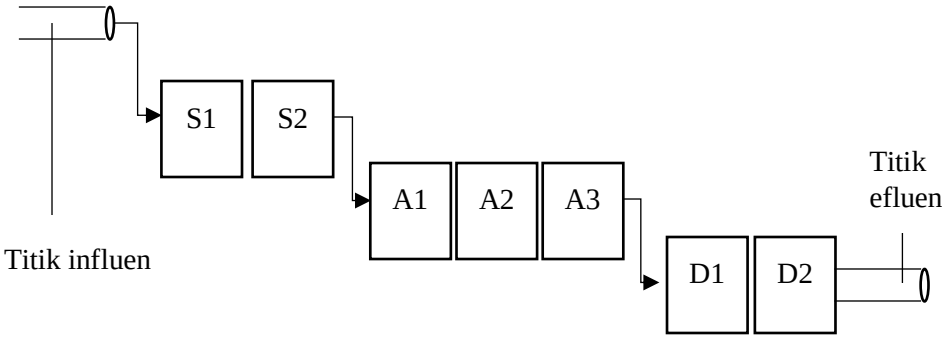
sulfamat, larutan standar KHP, asam nitrat, larutan induk logam raksa, larutan pengencer HNO_3, larutan kalium persulfat, gas argon HP, asam sulfat, asam klorida pekat, silika gel, dan aquades. Selain itu, hewan uji yaitu ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berusia 25 hari yang berukuran 1-3 cm.

3.5. Metode Sampling

Sampel limbah lindi diambil dari influen dan efluen IPL TPST Piyungan Bantul dengan metode grab sample yaitu air limbah yang diambil sesaat pada lokasi tertentu, setiap pengambilan sebanyak 40 liter masing-masing influen dan efluen. Timbulan (debit) lindi serta kualitasnya yang keluar dari timbunan sampah sangat berfluktuasi karena bergantung pada curah hujan serta karakter sampah yang ditimbun (Damanhuri, 2008).

Metode pengambilan sampel dilakukan dengan mengacu pada SNI 6989.59:2008 tentang Air dan Air Limbah, Bagian 59: Metoda Pengambilan Contoh Air Limbah. Alat untuk mengambil contoh harus memenuhi beberapa persyaratan seperti terbuat dari bahan yang tidak akan merubah sifat dari contoh, mudah dicuci serta aman saat dibawa. Alat yang digunakan untuk pengambilan contoh dapat menggunakan ember plastik. Wadah yang akan digunakan untuk menyimpan contoh terbuat dari bahan gelas atau plastik poli etilen (PE) atau poli propilen (PP) atau teflon (*Poli Tetra Fluoro Etilen*, PTFE), dapat ditutup dengan rapat, bersih dari kontaminan , tidak berinteraksi dengan sampel dan tidak mudah pecah (SNI 6989-59, 2008).

Contoh uji yang akan diambil pada lokasi sebelum dan sesudah IPL, untuk titik lokasi sebelum IPL diambil pada titik dengan aliran bertubulensi tinggi agar terjadi pencampuran dengan baik, yaitu pada titik dimana limbah mengalir pada akhir proses produksi menuju ke IPL. Sedangkan pada lokasi setelah IPL diambil pada titik dimana air limbah yang mengalir sebelum memasuki badan air penerima (sungai).



Keterangan : S = Sedimentasi ; A = Aerasi ; D = Desinfeksi

Gambar 3. 5. Titik Sampel IPL TPST Piyungan

Saat dilakukan pengambilan sampel influen dan efluen, dilakukan pengukuran suhu dengan termometer , pH dengan pH meter, dan oksigen terlarut dengan DO meter di tempat. Jumlah sampel yang diambil sebanyak 100 liter masing-masing 50 liter influen dan 50 liter effluen yang digunakan untuk uji parameter 15 liter dan sisanya 85 liter untuk uji pendahuluan dan uji toksisitas secara duplo.

Tabel 3. 1. Acuan Parameter Uji Saat Pengambilan Sampel

No	Parameter	Satuan	Alat	Metode	Acuan
1	pH	-	pH-meter	-	SNI 06-6989.11-2004
2	Suhu	^{o}C	Termometer	-	SNI 06-6989.23-2005
3	DO	mg/ L	DO meter	*Membrane electrode method*	*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st Edition*, 2005 (4500-O G)

3.6. Uji Parameter

Berdasarkan Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia Nomor 59/Menlk/Setjen/Kum.1/7/2016 Tentang Baku Mutu Lindi Bagi Usaha dan/atau Kegiatan Tempat Pemrosesan Akhir Sampah, parameter uji untuk

lindi adalah pH, *Biochemical Oxygen Demand* / BOD, *Chemical Oxygen Demand* /COD, padatan tersuspensi total / TSS, Nitrogen total, Merkuri, dan Kadmium.

Tabel 3. 2. Parameter Uji Air Limbah

Parameter	Satuan	Metode	Acuan
BOD	mg/ L	Titrasi secara Iodometri (Modifikasi Azida)	SNI 6989.72-2009
COD	mg/ L	Refluks Tertutup secara Titrimetri	SNI 06-6989.2-2004
TSS	mg/ L	Gravimetri	SNI 6989.72-2009
N Total		Spektrofotometer secara Makro Kjeldahl	SK SNI M-47-1990-03
Merkuri	µg/ L	Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) – uap dingin atau Mercury Analyzer	SNI 6989.78-2011
Kadmium	mg/ L	Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) – nyala	SNI 6989.16-2009

3.7. Aklimatisasi Ikan

Aklimatisasi ikan adalah tahap awal bagi ikan untuk menyesuaikan diri sebagai hewan uji terhadap lingkungan yang baru. Proses aklimatisasi ikan dilakukan selama 7 hari (APHA, 1998). Air yang akan digunakan untuk aklimatisasi sebelumnya harus diaerasi terlebih dahulu. Pada tahap aklimatisasi ikan diberi pakan berupa pelet sebanyak 3% dari berat total ikan. Pemberian pakan dilakukan 2 kali dalam sehari dan diberi aerasi untuk menjaga oksigen terlarut tetap terpenuhi (SNI 01-6141, 1999).

Aklimatisasi dilakukan pada kondisi suhu 25°C – 30°C, pH 6,5 – 8,5 dan kandungan oksigen terlarut minimum 5 mg/L (SNI 01-6141, 1999). Pengamatan dilakukan setiap hari terhadap kondisi ikan nila. Jika ikan yang mati lebih dari 10% dari total hewan uji yang digunakan, maka kemungkinan besar air yang digunakan tidak memenuhi syarat untuk tempat hidup dan kondisi hewan uji kurang bagus. Sehingga air dan hewan uji tidak dapat digunakan untuk uji toksisitas (OECD,

2004). Selain itu, jika ikan tidak sehat, berubah warna selama proses aklimatisasi, atau ikan mengalami stres yang ditandai dengan perilaku ikan yang tidak seperti biasanya maka ikan-ikan tersebut juga tidak dapat digunakan untuk pengujian (US EPA, 1991).

3.8. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk memperkirakan nilai konsentrasi yang akan dipakai pada uji toksisitas. Pada tahap uji pendahuluan ini dilakukan pengujian awal selama 24 jam terkait konsentrasi lindi yang akan digunakan pada tahap uji toksisitas. Konsentrasi yang digunakan di tahap uji pendahuluan mengikuti konsentrasi pada tahap uji toksisitas yaitu 0% , 6,25 %; 12,5 %; 25 %; 50 %; dan 100 %, baik influen maupun efluen IPL TPST Piyungan (US EPA, 2000).

Pada uji pendahuluan ini menggunakan 20 ekor ikan pada setiap reaktor dengan perbandingan 0,5 - 1 gram ikan/liter air. Rata-rata umur ikan adalah 3-4 minggu dan panjang badan 1-3 cm. Volume air yang digunakan untuk satu reaktor uji pendahuluan adalah 10 liter (Adiguno, 2004).

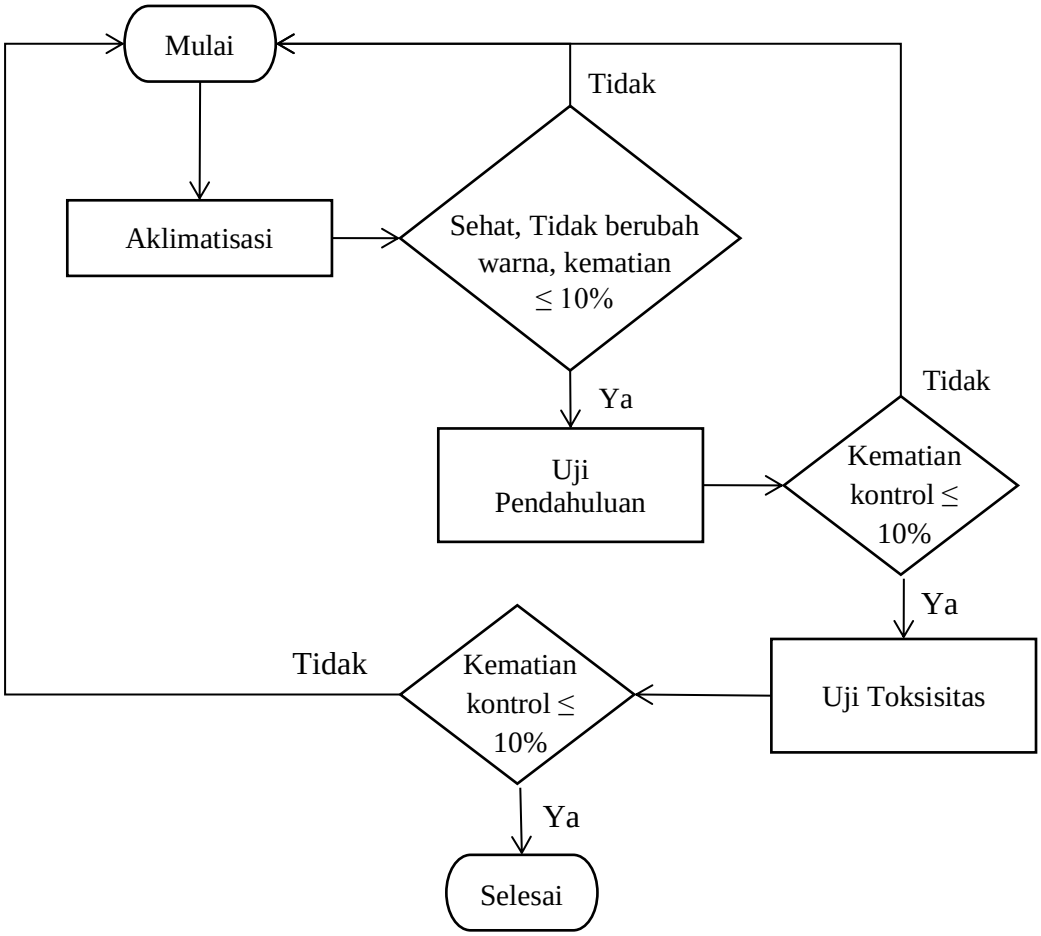
Selama proses uji pendahuluan parameter pH, oksigen terlarut dan juga suhu tetap di ukur. Selama proses uji pendahuluan menggunakan aerator di tiap akuarium agar kebutuhan oksigen tetap terpenuhi yaitu minimum 5 mg/L (SNI 01-6141, 1999). Uji pendahuluan dikatakan berhasil apabila ikan pada reaktor kontrol matikurang dari 10% (US EPA, 1991).

3.9. Uji Toksisitas dengan WET

Uji *Whole Efluen Toxicity* dilakukan dengan metode *Multi Concentration Efluen Toxicity Test* untuk menentukan toksisitas efluen yang belum diketahui secara pasti kisarannya. Metode ini dilakukan dengan menggunakan 5 konsentrasi sampel dan 1 konsentrasi kontrol. Konsentrasi air lindi yang digunakan berdasarkan hasil dari uji pendahuluan yang sebelumnya dilakukan baik influen maupun efluen IPL TPST Piyungan (US EPA, 2000).

Penentuan konsentrasi berdasarkan hasil uji pendahuluan yaitu ketika hewan uji mengalami kematian sebelum 24 jam maka konsentrasi terendah dengan kematian 100% dikalikan dengan faktor pengencer 0,5 sebagai konsentrasi tertinggi pada uji toksisitas (US EPA, 2000).

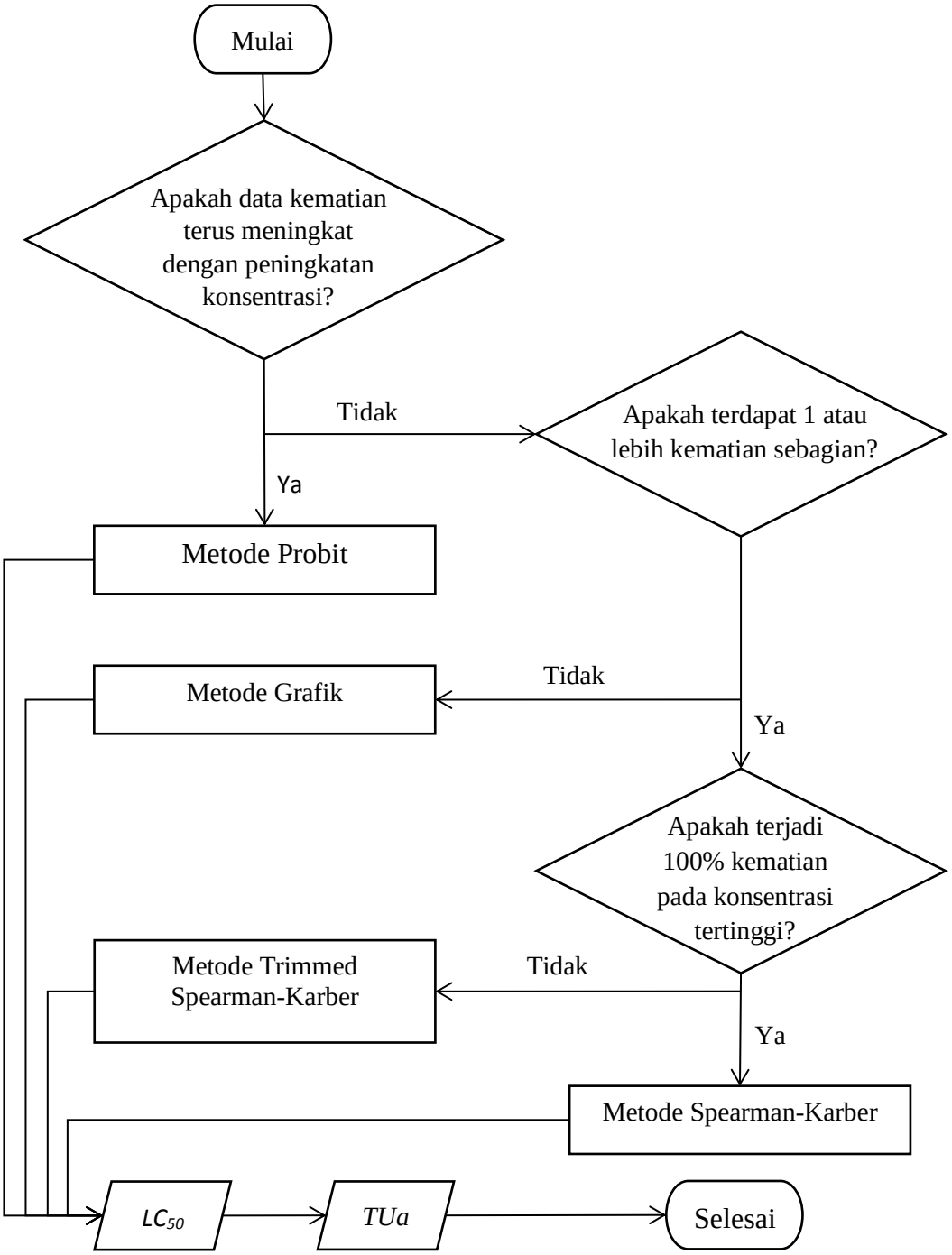
Kematian diamati setiap 24, 48, 72, dan 96 jam. Pengujian dilakukan dengan tipe *static non renewal* yaitu menggunakan limbah yang sama sampai akhir pengujian dan dilakukan di laboratorium. Selain itu, ikan yang terdapat pada reaktor kontrol harus hidup minimal 90% dari total hewan uji (US EPA, 2000). Selama proses uji pendahuluan parameter pH, oksigen terlarut dan juga suhu tetap di ukur. Selama proses uji pendahuluan menggunakan aerator di tiap akuarium agar kebutuhan oksigen tetap terpenuhi yaitu minimum 5 mg/L (SNI 01-6141, 1999). Pemantauan dilakukan setiap 24 jam untuk mengamati jumlah kematian hewan uji disetiap konsentrasi. Untuk lebih ringkasnya dapat dilihat pada gambar 3.6 dibawah ini:



Gambar 3. 6. Diagram Alir Uji Toksisitas

3.10. Analisis Data

Metode yang digunakan untuk memperkirakan LC50 dari uji toksisitas akut dengan multi-konsentrasi tergantung pada hasil mortalitas konsentrasi influen dan efluen. Ada empat metode untuk memperkirakan LC50 yaitu Metode Grafis, Metode Spearman-Karber, Metode Trimmed Spearman-Karber, dan Metode Probit. Skema analisis ditunjukkan pada Gambar 3.7. Metode Probit, Metode Spearman-Karber, dan Metode Spearman-Karber Trimmed dirancang untuk menghasilkan nilai LC50 dan interval kepercayaan 95% terkait (US EPA, 2002).



Gambar 3. 7. Alur Analisis Data

Metode probit digunakan untuk menghitung LC_{50} dengan persentase lindi tertentu. Untuk mendapatkan nilai LC_{50} terlebih dahulu menghitung mortalitas. Lalu membuat grafik dengan sumbu x sebagai log konsentrasi dan sumbu y mortalitas. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi dimana konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% yang di peroleh dengan persamaan regresi linier yaitu:

$$Y = a + bx \text{ (Persamaan 1)}$$

Metode probit digunakan apabila data kematian ikan yang dimiliki terus meningkat seiring bertambahnya konsentrasi limbah yang diujikan. Data direkomendasikan untuk dianalisis menggunakan program komputer (*software* komputer *EPA Probit Analysis Program Used for Calculating LC/ EC Values Version 1.5*) (US EPA, 2002).

Metode grafik memperkirakan LC50 dengan interpolasi linier antara titik-titik plot kematian persentase yang diamati versus logaritma konsentrasi 10 logaritma (log10). Dengan metode grafik ini tidak memberikan interval kepercayaan untuk perkiraan LC50. Penggunaan metode grafik hanya disarankan bila tidak ada mortalitas parsial. Satu-satunya persyaratan untuk metode grafik adalah bahwa persen mortalitas persen yang teramati 50% (US EPA, 2002).

Metode Spearman-Karber memperkirakan rerata distribusi log10 toleransi. Jika distribusi toleransi log simetris, perkiraan rata-rata ini setara dengan perkiraan median dari distribusi toleransi log. Jika data tidak monoton dan tidak menurun dengan meningkatnya konsentrasi (konstan atau terus meningkat dengan konsentrasi) maka data akan lancar. Penggunaan Metode spearman-karber direkomendasikan ketika mortalitas parsial terjadi dalam larutan uji, tetapi datanya tidak sesuai dengan model probit (US EPA, 2002).

Metode Trimmed Spearman-Karber adalah modifikasi dari prosedur Spearman-Karber untuk memperkirakan LC50 Penggunaan Metode Trimmed Spearman-Karber jika persyaratan untuk Metode Probit dan Metode Spearman-Karber tidak terpenuhi (US EPA, 2002).

3.11. *Toxic Unit* (TU)

Toxic Unit (TU) adalah ukuran toksisitas dalam limbah yang ditentukan oleh unit toksisitas akut (TUa) atau unit toksisitas kronis (TUc) diukur. TU yang lebih tinggi mengindikasikan toksisitas yang lebih besar. Unit toksisitas akut (Tua) yang merupakan timbal balik konsentrasi efluen yang menyebabkan 50 persen organisme mati. Untuk menentukan unit toksisitas akut (TUa) dihitung dengan:

$$TUa = 100/ LC_{50} \text{ (US EPA, 2010)(Persamaan 2)}$$

Keterangan :

TUa = unit toksisitas akut

100 = konsentrasi efluen 100 kali

LC_{50} = konsentrasi yang menyebabkan 50% dari organisme mati

Setelah didapatkan nilai Tua,diklasifikasikan berdasarkan tabel berikut:

Tabel 3. 3. Klasifikasi Toksisitas

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	High acute toxicity	10-100	3
4	Class IV	Very high acute tovicity	>100	4

Sumber: (Vaajasaari, 2005)

Setelah didapatkan nilai toksisitas air lindi maka dilakukan analisis multivariat yang bertujuan untuk mengolah variabel dalam jumlah yang banyak, dimana tujuannya adalah untuk mencari pengaruh variabel-variabel terhadap suatu objek secara serentak. Analisis ini berfungsi untuk menganalisa apakah ada hubungan antara persentase kematian dengan parameter pengujian lainnya (Supranto, 2010).