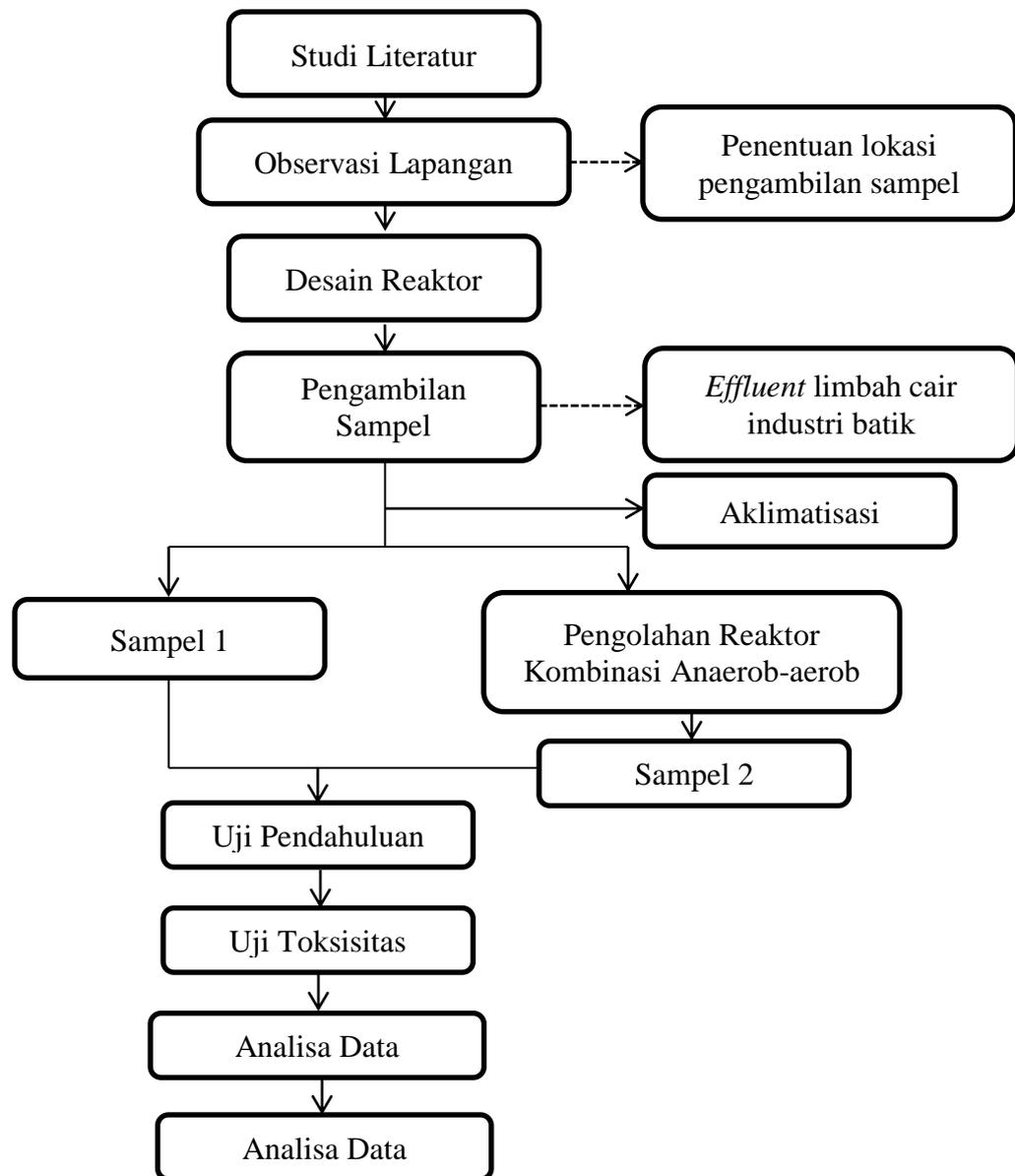


**BAB III**  
**METODE PENELITIAN**

**3.1 Tahap Penelitian**

Tahap penelitian ini diawali dengan pendalaman latar belakang untuk mengetahui permasalahannya, kemudian dilakukan studi literatur yang mendukung permasalahan mengenai pengujian toksisitas.



**Gambar 3.1** Diagram Alir Penelitian

### 3.2 Lokasi Penelitian

Lokasi pada penelitian ini yaitu di industri batik Giriloyo, Kabupaten Bantul, DIY sebagai tempat pengambilan sampel uji. Kemudian pelaksanaan pengujian akan dilakukan di Laboratorium Kualitas Lingkungan Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan (FTSP) Universitas Islam Indonesia, Jalan Kaliurang Km 14,5.

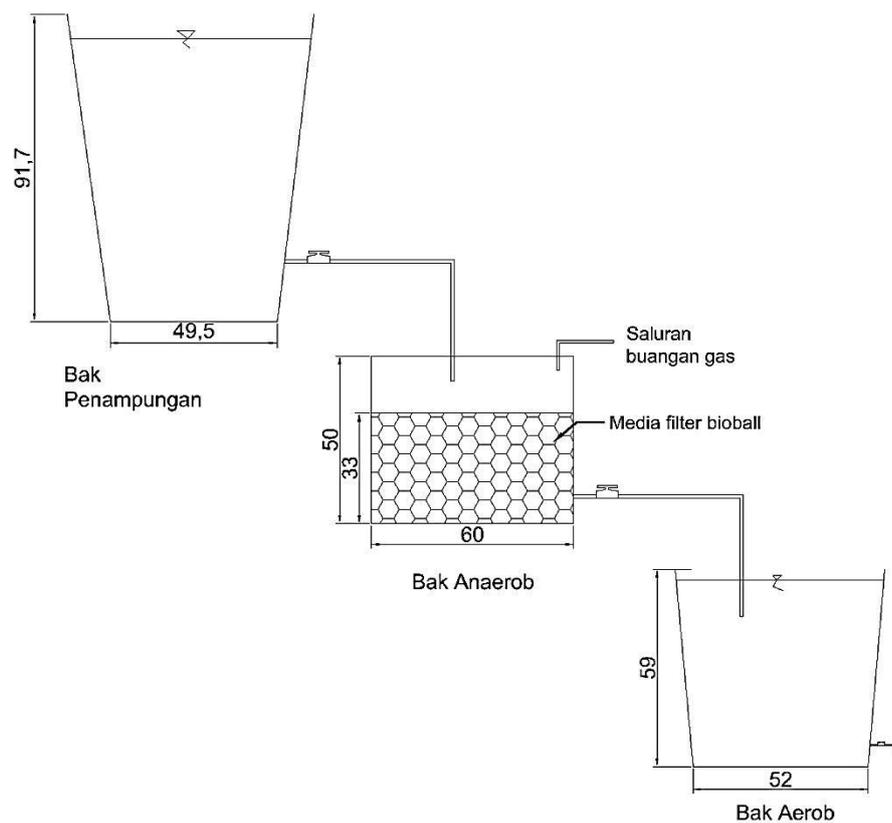
### 3.3 Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan alat-alat meliputi wadah sampel, reaktor anaerob-aerob uji *effluent* yang dilengkapi dengan filter *bioball* sebagai alat untuk mengolah limbah sebelum diuji kadar toksisitasnya sebagai perbandingan dengan kadar toksisitas *effluent* tanpa pengolahan. Wadah akuarium dibutuhkan untuk aklimatisasi hewan uji serta untuk wadah pengamatan mortalitas hewan uji. Pada akuarium dilengkapi dengan aerator untuk menjaga kadar oksigen dalam air. pH meter, termometer, dan DO meter dibutuhkan untuk melakukan pengujian kualitas air uji setiap harinya selama masa pengujian. Pada limbah yang akan digunakan juga diuji kadar Krom total (Cr) sebelum dan sesudah pengolahan untuk mengetahui apakah kandungan Krom yang disebutkan dalam karakteristik limbah tekstil terkandung dalam limbah yang akan digunakan dan melihat kaitannya dengan uji toksisitas. Bahan yang digunakan yaitu sampel limbah cair industri batik, akuades untuk mengencerkan limbah pada saat pengujian, Ikan Mas (*Cyprinus carpio*), dan pakan untuk menjaga kondisi ikan pada saat aklimatisasi. Ikan yang akan digunakan berasal dari tempat pembenihan di wilayah Sleman yaitu Budi Fish Farm dan petani benih ikan di daerah Prambanan.

### 3.4 Desain Reaktor

Dalam penelitian ini reaktor kombinasi anaerob-aerob didesain dan digunakan untuk membandingkan tingkat toksisitas akut limbah cair industri batik sebelum dan sesudah pengolahan. Unit pengolahan limbah batik menggunakan reaktor kombinasi anaerob-aerob terdiri dari 3 bak yaitu, bak penampungan, bak

anaerob, bak aerob. Bak penampungan menggunakan material yang berbahan plastik yaitu ember dengan kapasitas 150 liter, dan untuk bak anaerob dan aerob menggunakan material yang berbahan kaca. Bagian penting dalam proses pengolahan ini adalah bak anaerob dengan volume total 180 liter dengan dimensi 60 cm x 60 cm x 50 cm. Dalam bak anaerob ditambahkan media filter dengan ketinggian 33 cm, dan bak aerob kapasitas 80 liter dengan bantuan aerator, adapun desain reaktor kombinasi anaerob-aerob sebagai berikut:



**Gambar 3.2** Reaktor Kombinasi Anaerob-aerob

Desain reaktor kombinasi anaerob-aerob menggunakan sistem gravitasi dalam mentrasfer limbah yang akan diolah serta pada setiap tahapan alat dilengkapi dengan *valve* untuk mengatur aliran limbah. Bak penampung yang digunakan menggunakan ember yang memiliki kapasitas 150 liter dan diletakkan pada ketinggian diatas bak anaerob agar pengolahan dilakukan secara *downflow*.

Pada reaktor anaerob dilengkapi dengan media filter *bioball* sebagai penyaring sekaligus tempat melekatnya *biofilm*. Reaktor anaerob terbuat dari bahan kaca yang memiliki dimensi 60 cm x 60 cm x 50 cm dengan total kapasitas 180 liter. Kemudian pada reaktor aerob memiliki kapasitas sebesar 80 liter yang akan dilengkapi dengan aerator untuk memastikan bahwa pengolahan aerob berjalan maksimal.

### 3.5 Pengambilan Sampel

Sampling dilakukan di industri batik Giriloyo, Bantul dengan pengambil *effluent* limbah cair yang dihasilkan dari proses akhir pewarnaan batik. Limbah langsung diambil dari limbah yang telah terkumpul di bak pengumpul.

Untuk pengambilan contoh limbah mengacu pada SNI 6989.59.2:2008 tentang metode pengambilan contoh air limbah.

### 3.6 Pelaksanaan Pengolahan Limbah Cair Kampung Batik Giriloyo

Pengolahan dimulai dengan proses *seeding* dan aklimatisasi. Proses *seeding* dalam penelitian ini mengembangkan bakteri menggunakan EM4 dengan perbandingan volume 1:20. Proses aklimatisasi dimulai hingga mikroorganisme berada pada kondisi *steady state* yang ditandai dengan tidak adanya kenaikan COD dan tidak mengalami fluktuasi COD lebih dari 10% sehingga dapat dilakukan tahap lanjutan (Helard,2010).

Langkah selanjutnya adalah *running* air limbah dengan waktu tinggal tiga hari. Dalam pengoperasian reaktor ini menggunakan sistem *batch*. Prinsip dari reaktor *batch* yaitu reaktor diisi dengan reaktan dan disimpan selama waktu tertentu yang kemudian dilihat perubahan kualitasnya pada selang waktu tertentu. Pengoperasian awal reaktor ini dilakukan dengan mengalirkan air limbah ke bioreaktor anaerob secara *down flow*. Pengambilan sampel dilakukan setelah *dibatch* selama 1, 2 dan 3 hari di bak anaerob, kemudian dialirkan ke bak aerob dan diaerasi selama 1, 2, dan 3 hari. *Effluent* hasil pengolahan anaerob maupun aerob dianalisis parameter warna, BOD, COD, dan TSS, dan total krom. Setelah

melalui reaktor aerob *effluent* dialirkan ke bak pengendapan untuk menstabilkan aliran. *Effluent* hasil pengolahan yang telah melalui pengolahan anaerob tiga hari dan aerob tiga hari saja yang akan diuji tingkat toksisitasnya terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*).

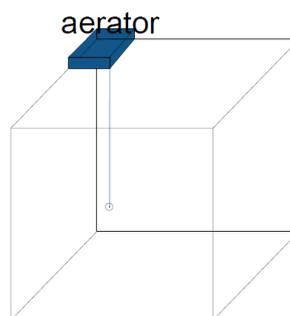
### 3.7 Hewan Uji

Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dipilih dalam penelitian ini karena sesuai dengan persyaratan hewan uji dan sesuai dengan hewan yang mewakili kondisi dimana hasil penelitian akan digunakan. Ikan yang digunakan berumur 1-1,5 bulan atau memiliki panjang 3-5 cm dan memiliki ukuran serta kondisi fisiologi yang relatif sama seperti dari jenis ikan mas merah atau mas hitam (Rudiyanti dan Astri, 2009).

### 3.8 Pengujian Toksisitas

Pengujian toksisitas terhadap ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dilakukan untuk membandingkan nilai  $LC_{50}$  pada masing-masing pengujian yaitu terhadap limbah *influent* dan *effluent* yang selanjutnya akan diketahui nilai TUA nya. Uji toksisitas menggunakan metode Whole Effluent Toxicity (WET) dilakukan dengan pengujian multi konsentrasi untuk menentukan kisaran toksisitas sampel uji dan dilakukan dengan tipe *static non renewal* yaitu pengujian dilakukan dengan menggunakan limbah yang sama hingga akhir pengujian tanpa adanya pergantian limbah atau pemindahan hewan uji (USEPA, 2002).

Penelitian skala laboratorium ini menggunakan sampel uji yaitu *effluent* limbah cair industri batik Giriloyo yang diambil dan disimpan sesuai dengan ketentuan. Dalam pengujian toksisitas akut terhadap hewan uji dilakukan proses aklimatisasi, uji pendahuluan (*finding range test*), serta uji definitif (*toxicity test*).



**Gambar 3.3** Reaktor Pengujian Toksisitas Limbah Batik

Dalam uji pendahuluan dan uji toksisitas digunakan reaktor yang memiliki ukuran panjang x lebar x tinggi yaitu 30 cm x 30 cm x 30 cm yang terbuat dari kaca tembus cahaya dengan ketebalan 5 milimeter. Kapasitas reaktor hanya digunakan sebanyak volume limbah yang diujikan yaitu 10 liter pada masing-masing reaktor. Selama pengujian reaktor diletakkan dalam laboratorium tanpa penutup.

Uji Toksisitas untuk menguji tingkat toksisitas *effluent* limbah cair industri batik pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dilakukan perlakuan pada ikan dalam akuarium dengan beberapa konsentrasi berbeda untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  limbah tersebut.

### 3.8.1 Aklimatisasi Hewan Uji

Aklimatisasi dilakukan untuk mengkondisikan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) agar dapat menyesuaikan dengan lingkungan yang baru. Selama proses aklimatisasi ikan diberi makan pelet setiap pagi dengan aerasi yang cukup untuk menjaga kadar oksigen selama proses aklimatisasi berlangsung. Pemberian pakan sebanyak 3% dari bobot ikan akan memberikan pertambahan berat badan yang cukup baik (Ardita, et. al., 2015). Suhu dalam akuarium aklimatisasi juga dijaga dengan temperatur 25<sup>0</sup>C- 30<sup>0</sup>C (Husni et. al., 2012). Proses aklimatisasi ini dilakukan selama 7 hari, sehari sebelum siap digunakan dan selama proses pengujian ikan dipuasakan (Tyas et. al., 2016). Ikan yang mati selama proses ini akan segera dibuang untuk menjaga keadaan air agar tidak bau dan mempengaruhi

ikan lainnya. Jumlah kematian ikan pada tahap aklimatisasi sebesar >10% akan dilakukan pengulangan uji karena dianggap kondisi ikan sudah tidak baik untuk digunakan pada pengujian toksisitas.

Hal tersebut memastikan agar hewan uji siap untuk diujikan dan tidak berada pada kondisi dimana akan berpengaruh pada uji toksisitas seperti keadaan yang tidak sehat yang akan mempengaruhi hasil uji. Tingkat DO pada tahap aklimatisasi minimal 6,0 mg/L untuk pengujian hewan air tawar (USEPA, 2002) dan untuk kandungan suhu berada pada temperatur 25<sup>0</sup>C- 30<sup>0</sup>C serta pH 6-8,5.

### 3.8.2 Uji Pendahuluan

Pada tahap uji pendahuluan sampel *effluent* limbah cair industri batik di uji untuk menentukan batas kisaran kritis (*critical range test*) yang selanjutnya menjadi dasar dari penentuan konsentrasi pada uji toksisitas (Husni et. al., 2012). Uji pendahuluan menentukan nilai batas atas (N) yang menunjukkan konsentrasi terkecil yang menyebabkan mortalitas hewan uji dalam paparan 24 jam dan nilai batas bawah (n) yang menunjukkan konsentrasi terbesar yang tidak menyebabkan mortalitas hewan uji dalam paparan 48 jam (Zulfahmi et. al., 2017).

Pengenceran uji WET dalam penentuan toksisitas akut (LC<sub>50</sub>) digunakan faktor pengenceran 0,5 dalam menentukan batas bawah faktor pengenceran untuk mempersiapkan konsentrasi larutan uji. Rentan nilai konsentrasi yang digunakan yaitu 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% dalam kapasitas 10L air (USEPA, 2000). Hewan uji akan dimasukkan dalam 6 akuarium berisi air yang telah ditambah *effluent* dengan konsentrasi berbeda masing-masing 20 ekor. Pengamatan mortalitas hewan uji dilakukan pada jam ke-0, 24, 48 dengan tetap memperhatikan perubahan perilaku dan morfologi ikan selama pengujian serta tetap dilakukan pemberian aerasi.

### 3.8.3 Uji Toksisitas Akut

Konsentrasi yang didapat dari uji pendahuluan digunakan untuk menentukan konsentrasi pada uji toksisitas akut dengan berdasarkan rumus berikut (Zulfahmi et. al., 2017):

$$\mathbf{Log} \left( \frac{N}{n} \right) = k \mathbf{Log} \left( \frac{a}{n} \right)$$

Keterangan:

N: konsentrasi batas atas

n: konsentrasi batas bawah

a: konsentrasi terkecil dalam pengujian

k: jumlah konsentrasi yang diujikan

Dengan:

$$\left( \frac{a}{n} \right) = \left( \frac{b}{a} \right) = \left( \frac{c}{b} \right) = \left( \frac{d}{c} \right) = \left( \frac{e}{d} \right)$$

Keterangan:

n: konsentrasi batas bawah

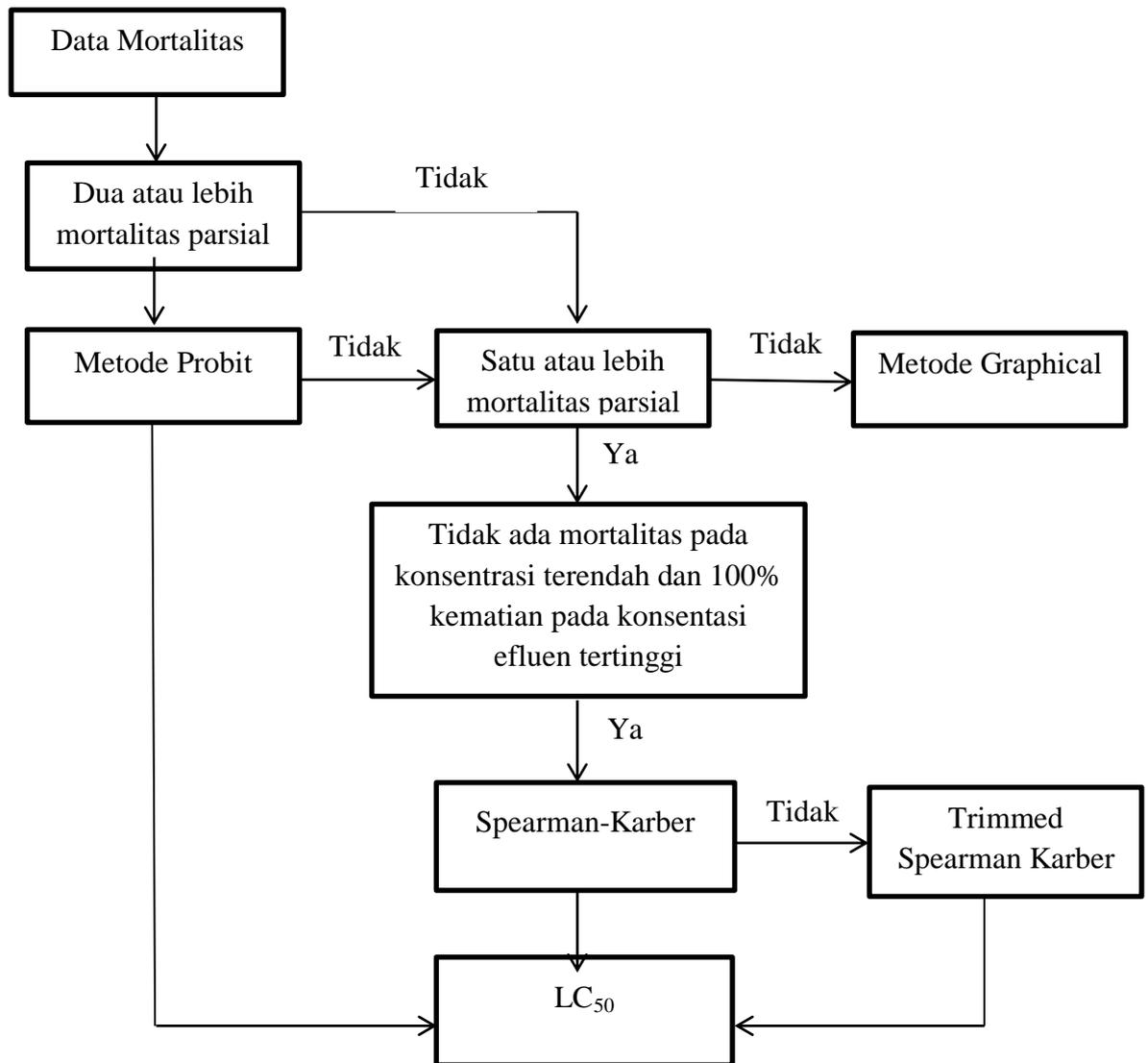
a: konsentrasi terkecil dalam pengujian

b, c, d, e: nilai konsentrasi yang diujikan

Uji toksisitas *effluent* limbah cair industri batik dilakukan pengamatan mortalitas hewan uji jam ke-0, 24, dan seterusnya dengan pengulangan 12 jam hingga 96 jam. Pengukuran kualitas air dilakukan setiap hari dengan parameter suhu, pH, dan DO. Pada tahap ini hewan uji diberi makan dan setiap perlakuan diberi aerasi. Data mortalitas kemudian di analisis untuk menentukan toksisitas LC<sub>50</sub> dengan metode analisa probit (Metode Hubbert) (Warsito et. al., 2015).

### 3.9 Analisa Data

Analisis yang digunakan untuk memperkirakan nilai LC<sub>50</sub> toksisitas akut pada *Whole Effluent Toxicity* (WET) multi konsentrasi bergantung pada konsentrasi limbah dan jumlah mortalitas parsial. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan beberapa metode sesuai dengan (USEPA, 2002), yaitu metode Probit, Trimmed Spearman Karber, Spearman Karber dan Graphical. Metode perhitungan LC<sub>50</sub> dapat dilihat pada gambar 3.4.



**Gambar 3.4** Diagram Pemilihan Metode Perhitungan  $LC_{50}$

Data mortalitas dari uji toksisitas dianalisa dengan mengacu pada analisa probit (Metode Hubbert) untuk menentukan nilai  $LC_{50}$ . Analisis probit merupakan hubungan nilai logaritma konsentrasi bahan toksik uji dan nilai probit dari persentase mortalitas hewan uji yang merupakan fungsi linier.

Nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan digunakan untuk menentukan *Toxic Unit Acute* (TUa) dapat dihitung dengan formula:

$$TUa = \left( \frac{100}{LC_{50}} \right)$$

Nilai TUa merupakan timbal balik dari konsentrasi limbah yang menyebabkan 50% organisme mati pada akhir uji toksisitas akut. Berdasarkan (Persoone et. al., 2003) klasifikasi bahaya untuk limbah yang dibuang ke dalam lingkungan akuatik membagi kelas untuk tingkatan nilai TU pada **Tabel 3.1**.

**Tabel 3.1** Klasifikasi Nilai TU

<b>TU</b>	<b>Kelas</b>	<b>Keterangan</b>
<0,4	Kelas I	<i>No acute toxicity</i>
0,4 < TU < 1	Kelas II	<i>Slight acute toxicity</i>
1 < TU < 10	Kelas III	<i>Acute toxicity</i>
10 < TU < 100	Kelas IV	<i>High acute toxicity</i>
TU > 100	Kelas V	<i>Very high acute toxicity</i>

*Sumber:* (Persoone et. al., 2003)