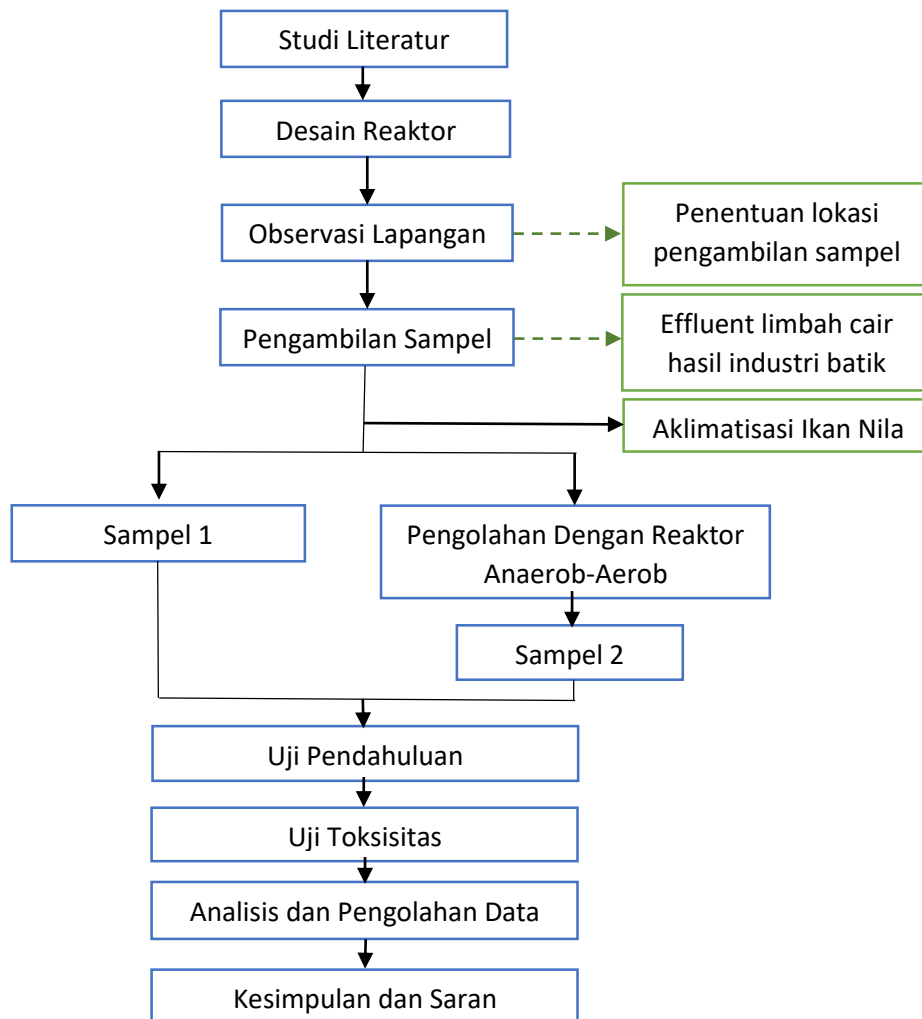


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Diagram Alir

Penelitian ini diawali dengan studi literatur yang berhubungan dengan penelitian yang akan dilaksanakan. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada diagram alir dibawah.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.2 Lokasi Penelitian

Limbah batik digunakan berasal dari Kampung Batik Giriloyo, Wukirsari Bantul Yogyakarta. Perjalanan ditempuh dalam waktu kurang lebih satu jam dari Universitas Islam Indonesia menuju ke lokasi. Tujuan dilakukannya penelitian di lokasi ini adalah karena limbah hasil dari pembuatan batik sudah lama tidak diolah dan langsung dibuang ke lingkungan. Aklimatisasi ikan nila dan uji toksisitas akan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Lingkungan Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia.

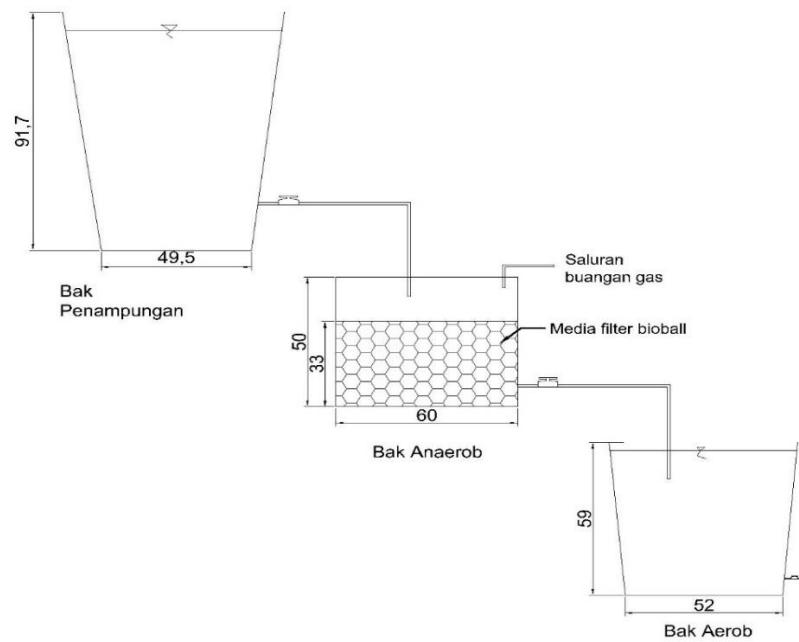
3.3 Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan adalah akuarium atau kontainer sebagai wadah yang akan digunakan untuk meletakkan hewan uji, gelas ukur untuk mengukur konsentrasi bahan yang akan digunakan, thermometer untuk mengukur suhu air, pH meter untuk mengukur kadar pH dalam air, DO meter untuk mengukur kandungan oksigen yang terdapat dalam air, neraca analitik untuk menimbang hewan uji, kertas label, alat tulis, jaring ikan. Bahan-bahan yang dibutuhkan diantaranya: ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang berusia kurang lebih 3-4 minggu, pakan ikan, limbah cair industri batik, dan air sebagai media hidup hewan uji.

3.4 Desain Reaktor

Unit pengolahan limbah batik menggunakan reaktor kombinasi anaerob-aerob terdiri dari 3 bak yaitu, bak penampungan, bak anaerob dan bak aerob. Bak penampungan menggunakan ember dengan kapasitas 150 liter sedangkan untuk bak anaerob dan bak aerob menggunakan material yang berbahan kaca. Bak anaerob memiliki volume total 180 liter dengan dimensi 60 cm x 60 cm x 50 cm. Bioball sebagai media filter ditambahkan dalam dalam bak anaerob dengan ketinggian 33 cm, dan bak aerob memiliki kapasitas 80 liter dengan bantuan

aerator, adapun desain reaktor kombinasi anaerob-aerob sebagai berikut. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 Desain Reaktor Kombinasi Anaerob-Aerob dalam satuan cm

3.5 Metode Sampling

Sebelum limbah diolah terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel, sampel atau limbah yang diambil adalah merupakan hasil akhir dari proses pengolahan batik sebelum dibuang ke sumur pengumpul. Teknik pengambilan sampel yang akan dilakukan pada penelitian ini mengacu pada SNI 6989.59:2008 tentang Air dan Air Limbah, bagian 59: Metode Pengambilan Contoh Air Limbah. Peralatan yang digunakan untuk mengambil contoh harus memenuhi kriteria sebagai berikut: bahan yang digunakan tidak mempengaruhi sifat dari sampel yang diambil, mudah dibersihkan dan tidak meninggalkan sampel sebelumnya, sampel mudah dipindahkan dan tidak meninggalkan bahan terendapkan didalamnya, mudah dan aman untuk dibawa, ukuran alat yang digunakan sesuai dengan jumlah sampel yang dibutuhkan.

Wadah untuk menampung sampel juga memiliki syarat sebagai berikut: terbuat dari bahan gelas atau plastik Poli Etilen (PE) atau Poli Propilen (PP) atau Teflon (Poli Tetra Fluoro Etilen atau PTFE), dapat ditutup kuat dan rapat, bebas dari kontaminan, tidak mudah pecah, dan jika dikontakkan dengan sampel tidak mempengaruhi sifat sampel.

3.6 Pengoperasian Reaktor

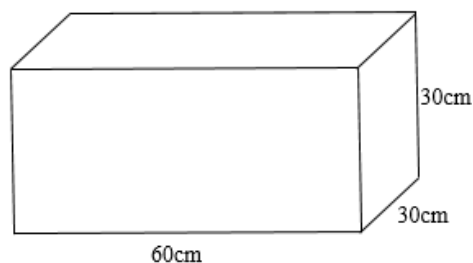
Setelah reaktor siap langkah pertama yang dilakukan adalah seeding, seeding merupakan proses pengembangbiakkan mikroorganisme yang akan digunakan pada suatu limbah. Seeding dilakukan dengan cara memasukkan bioball, selanjutnya ditambahkan EM₄ dan air dengan perbandingan 1 : 20 yaitu 2 liter EM₄ dan 40 liter air. Agar mikroba tetap hidup maka ditambahkan gula cair setiap 2 hari sekali, gula cair berfungsi sebagai nutrient untuk mikroba agar dapat berkembangbiak. Ada beberapa indikator keberhasilan dari proses seeding ini yaitu pH mengalami peningkatan lebih besar dari 4, terbentuknya lendir atau lapisan putih pada permukaan bioball, dan berbau gula. Jika sudah dapat dikatakan

berhasil maka langkah selanjutnya adalah melakukan aklimatisasi terhadap mikroba. Aklimatisasi dilakukan dengan cara menambahkan limbah batik kedalam reaktor yang telah mengalami proses seeding. Limbah yang ditambahkan yaitu sebanyak 80 liter atau dengan perbandingan 1:2 dengan hasil seeding. Aklimatisasi dilakukan hingga fluktuasi penurunan COD tidak melebihi 10%, karena dianggap sudah stabil dan mikroba dalam kondisi *steady state*, dan pembentukan biofilm masih berlanjut. Selanjutnya jika aklimatisasi telah berhasil maka dilakukan proses *running*. Seluruh limbah yang terdapat dalam reaktor dibuang kemudian diganti dengan limbah baru sampai reaktor penuh, selanjutnya limbah tersebut di batch selama 1 hari kemudian dialirkan ke reaktor aerob dan didiamkan selama 1 hari kemudian di cek. Selanjutnya 2 hari dalam anaerob kemudian dialirkan ke dalam reaktor aerob setelah 1 hari di cek kemudian didiamkan lagi sampai 2 hari dan di cek lagi. Limbah yang telah 3 hari di batch kemudian di alirkan juga ke dalam reaktor aerob kemudian dilakukan pengecekan setian hari selama 3 hari. Uji toksistas yang akan dilakukan yaitu pada efluen hasil reaktor kombinasi anaerob-aerob yang telah di batch selama 3 hari pada reaktor anaerob dan 3 hari pada reaktor aerob.

3.7 Aklimatisasi Ikan Nila (*Oreochromis Nilaticus*)

Aklimatisasi merupakan usaha penyesuaian fisiologis atau adaptasi suatu organisme terhadap lingkungan baru. Aklimatisasi sekaligus pembudidayaan organisme uji di laboratorium dilakukan dengan menempatkan ke dalam sebuah akuarium, yang diisi dengan air tawar yang telah diaerasi dengan aerator (USEPA, 2002). Hewan uji yang dipilih pada percobaan ini adalah ikan nila usia 4-6 minggu. Ikan nila dipilih sebagai hewan uji karena bibit ikan nila sangat peka terhadap berbagai kondisi perairan. Proses aklimatisasi berlangsung selama 7 hari, selama proses ikan tidak lupa diberi makan dan diukur pH, suhu, DO dan ditimbang berat badannya. Pemberian pakan ikan dilakukan dengan dosis 3% dari

total berat badan ikan, dosis ini diberikan karena pada dosis ini pertumbuhan ikan nila semakin tinggi (Nita, 2015). Berdasarkan SNI: 01-6141-1999 kriteria air yang cocok untuk bibit ikan nila ukuran 3-5 cm adalah dengan derajat keasaman (pH) air berkisar 6,5 – 8,5. Suhu yang dianjurkan adalah 25°C – 30°C. Untuk kandungan oksigen terlarut minimum 5 mg/L. Perilaku dan mortalitas ikan harus diamati setiap harinya, jika ditemukan ikan yang mengalami stress, kerusakan fisik dan mati maka harus segera disingkirkan agar tidak mempengaruhi yang lainnya. Aklimatisasi harus diulang jika kematian ikan melebihi 10% dari total keseluruhan karena dianggap keseluruhan ikan tidak sehat (USEPA, 2002). Proses aklimatisasi sebaiknya dilakukan dengan menggunakan wadah berbahan dasar kaca borosilikat atau dengan plastik non toksik, hal ini dilakukan agar pelepasan bahan beracun dapat diminimalisir. Pada penelitian ini wadah yang digunakan adalah sebuah kontainer berbahan plastik dengan ukuran 82 liter.



Gambar 3.3 Reaktor Aklimatisasi

3.8 Uji Toksisitas Akut (Whole Effluent Toxicity)

Pada uji toksisitas, parameter utama yang diamati adalah persentase kematian ikan selama 96 jam. Parameter pendukung lainnya yang diamati yaitu suhu, pH, dan oksigen terlarut (DO). Selanjutnya dilakukan uji pendahuluan dan uji toksisitas.

3.8.1 Pendahuluan

Uji pendahuluan bertujuan untuk menentukan konsentrasi ambang batas atas dan ambang batas bawah dari limbah batik yang kemudian didapatkan variasi konsentrasi baru untuk digunakan pada uji toksisitas. Terdapat lima perlakuan pada uji pendahuluan yaitu dengan konsentrasi limbah 6.25%, 12.5%, 25%, 50%, 100% (US EPA, 2000) dan konsentrasi 0% sebagai kontrol, dilakukan selama 48 jam. Selanjutnya sebanyak 20 ekor ikan nila yang telah diaklimatisasi dimasukkan kedalam 6 buah akuarium dengan ukuran 30cm x 30cm x 30cm dengan variasi konsentrasi limbah yang berbeda pada tiap akuarium. Uji pendahuluan dilakukan selama 48 jam dan dilakukan pengamatan kematian hewan dan pengecekan kualitas air setiap 24 jam.

3.8.2 Uji Toksisitas

Pada uji toksisitas bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas yang terdapat pada limbah sebelum dan sesudah diolah dengan menggunakan reaktor kombinasi anaerob-aerob. Lamanya waktu uji toksisitas tergantung dari kewajiban pembuat aturan dan pada hewan uji yang digunakan. Hasil pengujian dapat diterima jika pada kontrol tidak mengalami kematian lebih dari 10% (US EPA, 1991). Setelah mendapatkan batas atas dan batas bawah langkah selanjutnya adalah mencari variasi konsentrasi yang akan digunakan untuk uji toksisitas disarankan dengan menggunakan pengenceran sebesar 0,5 untuk konsentrasi uji (US EPA, 2000). Selain itu dapat dicari dengan menggunakan rumus logaritma, penentuan konsentrasi tersebut menggunakan cara Quantal Responses (Finney, 1971):

$$\text{Log} \left(\frac{N}{n} \right) = k \times \log \left(\frac{a}{n} \right) \quad \frac{a}{b} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{x}{d} \dots \dots \dots \frac{N}{x}$$

Keterangan:

N = Konsentrasi ambang batas atas

- n = Konsentrasi ambang batas bawah
- a = konsentrasi terkecil dalam deret konsentrasi yang digunakan
- b = konsentrasi ke-a dalam deret konsentrasi yang digunakan
- c = konsentrasi ke-b dalam deret konsentrasi yang digunakan
- d = konsentrasi ke-c dalam deret konsentrasi yang digunakan
- x = konsentrasi ke-x dalam deret konsentrasi yang digunakan
- k = jumlah interval konsentrasi yang diuji

Sebanyak 120 ekor hewan uji dibagi menjadi 6 perlakuan sehingga sebanyak 20 ekor ikan nila dimasukkan kedalam masing-masing akuarium dengan konsentrasi yang didapatkan dari perhitungan penentuan konsentrasi, selanjutnya diberi label sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Mortalitas ikan nila diamati pada periode waktu 24, 48, 72 dan 96 jam. Ikan nila yang telah mati dikeluarkan dari akuarium dan dicatat. Selama proses pengujian aerasi tetap dilakukan karena oksigen terlarut dalam air sangat berpengaruh terhadap kelangsung hidup hewan uji (Fleming, 2004). Selama proses pengujian pengukuran pH, DO dan suhu tetap dilakukan. Selanjutnya untuk penentuan nilai LC₅₀ dapat dilakukan dengan beberapa cara sesuai dengan hasil mortalitas ikan nila yang didapat.

3.9 Analisis Data

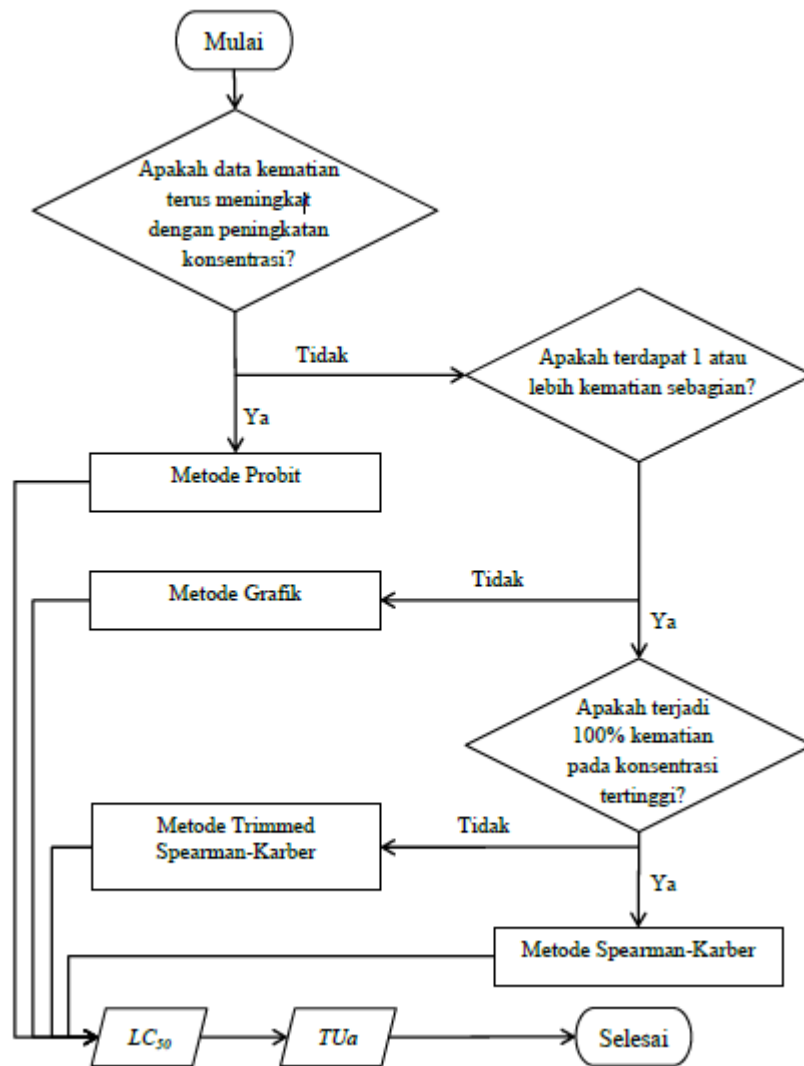
Pada penelitian ini metode yang akan digunakan adalah *Whole Effluent Toxicity* (WET) yaitu efek beracun agregat dari air limbah yang diukur langsung dengan menggunakan uji toksisitas akuatik. Pada uji toksisitas akuatik ini suatu organisme atau yang pada penelitian ini ikan nila akan dipaparkan limbah batik dengan konsentrasi yang berbeda-beda, kemudian diukur efek biologis dari organisme diukur seperti kematian, reproduksi dan kematiannya diperhatikan. Hasil dari pengujian ini yaitu berupa nilai LC₅₀ yang didapatkan dari kurva

hubungan antara konsentrasi dan respon organisme uji sehingga nantinya ditemukan titik pertemuan konsentrasi efek (US EPA, 2000).

Data yang didapat disarankan untuk dianalisis dengan menggunakan software komputer EPA Probit Analysis Program Used for Calculating LC/EC Values Version 1.5), namun metode probit ini dapat digunakan jika data mortalitas yang dihasilkan terus meningkat. Jika data mortalitas yang dihasilkan tidak meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi limbah maka dapat digunakan beberapa metode lain untuk mendapatkan LC50 dari suatu limbah, seperti metode grafik, Spearman karber, Trimmed Spearman Karber (US EPA, 2002). Metode grafik dapat digunakan jika pada pengujian tidak terdapat mortalitas parsial (sebagian) atau jika tidak ada kematian dan pada kematian 100% pada hewan uji. Metode Spearman-Karber digunakan saat terjadi kematian sebagian pada hewan uji namun datanya tidak sesuai dengan model probit, sehingga pada metode ini menyesuaikan data sehingga menjadi konstan. Sedangkan metode Trimmed Spearman-Karber merupakan modifikasi dari prosedur statistik non parametrik Spearman-Karber dan hanya digunakan ketika tidak terpenuhinya persyaratan untuk metode probit dan metode Spearman-Karber. Diagram alir analisis metode yang digunakan untuk menghitung kematian ikan dapat dilihat pada gambar 3.4.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.07	2.95	3.12	3.25	3.30	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Gambar 3.4 Tabel Probit



Gambar 3.5 Analisis Metode yang Digunakan
(US EPA, 2002)

Selain dengan penggunaan software penentuan nilai LC_{50} dengan analisa probit dapat dihitung dengan rumus:

$$b = \frac{\sum xy - 1/n \sum x \sum y}{\sum x^2 - 1/n(\sum x)^2}$$

$$a = 1/n \left(\sum y - b \sum x \right)$$

Persamaan regresi: $y = a + bx$

$LC_{50} - 96 \text{ jam} = \text{antilog } m$, dengan $m = \frac{5-a}{b}$

Dimana:

Y = nilai probit (table *Finney's*) berdasarkan nilai p

X = logaritma konsentrasi (mg/L)

y = Probit kematian hewan uji

x = logaritma konsentrasi hewan uji

a = konstanta (konsentrasi regresi)

b = slope (kemiringan regresi)

m = nilai x pada y 50%

n = jumlah perlakuan (Rand & Petrocelli, 1985).

Langkah selanjutnya setelah nilai LC_{50} didapatkan adalah menghitung *Toxic Unit Acute (TUa)* atau unit toksisitas akut. *Toxic Unit* adalah tingkatan toksisitas pada suatu effluent untuk menentukan apakah termasuk toksisitas akut (*TUa*) atau toksisitas kronis (*TUc*). Jika nilai toksik unit besar maka semakin besar juga tingkat toksisitasnya. Nilai *TUa* dapat dihitung dengan menggunakan rumus dibawah: (USEPA, 2010)

$$TUa = \frac{100}{Lc_{50}}$$

Setelah nilai TUa didapatkan maka dapat digunakan untuk melihat tingkat toksisitanya.

Tabel 3.1 Klasifikasi Tingkat Toksisitas

No	Kelas	Tingkat Toksisitas	Toxic Unit	Test Score
	(1)	(2)	(3)	(4)
1	Class 1	No acute toxicity	<1	1
2	Class 2	Significant acute toxicity	1-10	2
3	Class 3	High Acute toxicity	10-100	3
4	Class 4	Very high acute toxicity	>100	4

Sumber: Vaajasari, 2005