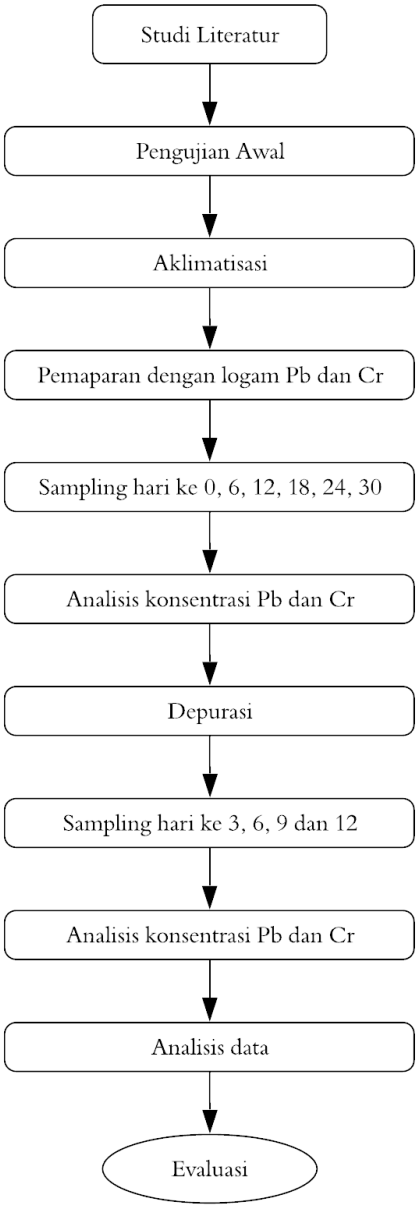
BAB III

METODE

3.1. Tahap Penelitian

Berikut adalah tahapan penelitian yang akan dilakukan :



Gambar 3.1 Diagram alir tahap penelitian

3.2. Studi Literatur

Studi literatur dilakukan untuk mendapatkan gambaran penelitian serta informasi-informasi dari studi terdahulu dengan membaca dan mengutip dari beberapa jurnal yang terkait dengan penelitian yang akan dilakukan kemudian dirangkum sesuai dengan topik penelitian.

3.3. Penelitian Awal

Sampel yang digunakan adalah ikan yang diperoleh dari Sungai Code hasil tangkapan warga sekitar. Sampel tidak ditentukan jenis, ukuran dan umurnya. Sampel hanya mengikuti ketersediaan ikan di lapangan pada saat sampling. Setelah sampel diperoleh, kemudian di bawa menuju ke laboratorium untuk selanjutnya dianalisis kandungan logam yang ada di dalam daging ikan. Analisis Pb sampel mengacu pada SNI 2354.5:2011 tentang Penentuan kadar logam berat Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) pada produk perikanan.

Hasil analisis data dari tahap penelitian awal ini akan dibandingkan dengan hasil Laporan Kualitas Air Sungai Provinsi D.I.Yogyakarta untuk menentukan konsentrasi logam Pb dan Cr yang akan digunakan sebagai konsentrasi paparan selama periode pemaparan ikan dengan logam (uptake).

3.4. Pemilihan Hewan Uji

Dalam penelitian ini, hewan uji yang digunakan sebagai bioindikator adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Pemilihan hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini telah didasari oleh beberapa syarat pemelihan hewan uji seperti :

1) Ikan nila merupakan jenis ikan yang mudah untuk dibudidaya karena dapat beradaptasi dengan cepat pada lingkungan yang baru dan tahan terhadap serangan penyakit (Ardita *dkk.*, 2015).
2) Jenis hewan uji yang akan digunakan dapat dengan mudah diperoleh (US EPA, 2002).

3) Jenis ikan yang akan digunakan merupakan jenis ikan yang sering dikonsumsi oleh masyarakat secara umum dan tersedia sepanjang tahun.

Bibit ikan nila yang digunakan dalam penelitaian ini mulai dari tahap aklimatisasi berjumlah 150 ekor yang berumur 3 bulan dengan ukuran yang seragam. Jumlah bibit ikan yang digunakan adalah dua kali lipat dari jumlah bibit ikan yang akan digunakan pada proses uptake dan depurasi. Penentuan jumlah ikan tersebut dilakukan untuk menghidari kekurangan sampel ikan yang akan digunakan pada proses uptake dan depurasi yang dapat terjadi akibat kematian ikan.

Bibit ikan nila dibeli dari peternakan ikan yang berlokasi di Sleman, DIY. Pemilihan lokasi/peternakan bibit ikan nila yang digunakan sebagai hewan uji dilakukan berdasarkan kondisi tempat peternakan/pemeliharaan ikan yang tidak jauh berbeda dengan kondisi laboratorium yang akan dijadikan tempat pemeliharaan ikan selama masa penelitian berlangsung. Bibit ikan nila yang diperoleh terlihat baik secara fisik kemudian dipisahkan berdasarkan ukuran yang sama ke dalam akuarium.

3.5. Aklimatisasi

Tahap aklimatisasi dilakukan untuk memberikan waktu kepada ikan agar dapat menyesuaikan diri dengan dengan lingkungan yang baru. Aklimatisasi dilakukan selama 14 hari untuk mengkondisikan ikan terhadap lingkungan barunya sehingga ikan mampu beradaptasi dengan baik hingga akhir proses penelitian dilakukan (EPA, 1996).

Aklimatisasi dilakukan menggunakan akuarium yang bersih yang terbuat dari kaca untuk menghindari terjadinyan kontaminasi (US EPA, 2002). Ukuran akuarium yang digunakan adalah 60 cm × 30 cm × 30 cm dengan *tap water* yang digunakan sebagai media pemeliharaan sebanyak 40 liter. Selain itu, akuarium juga dilengkapi dengan aerator yang berfungsi untuk memberikan suplai oksigen di dalam air dan filter (serta pompa) untuk menyaring kotoran yang ada di dalam air sehingga air tetap bersih. Selama masa aklimatisasi air diganti selama 6 hari sekali

untuk menjaga kualitas air yang digunakan. Semua alat yang digunakan dipastikan telah dicuci hingga bersih untuk menghindari adanya kontaminasi oleh polutan yang tidak diinginkan.

Selama masa aklimatisasi ikan diberi makan sebanyak tiga kali sehari dengan jumlah yang cukup. Adapun beberapa parameter kualitas air yang harus diperhatikan berdasarkan SNI 6141:2009 tentang Produksi benih ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus* Bleeker) kelas benih sebar adalah pH dengan kisaran 6,5-8,5, suhu air 25-30°C dan konsentrasi oksigen terlarut di dalam air >5 mg/L. Aklimatisasi dinyatakan berhasil ketika jumlah kematian hewan uji pada tahap aklimatisasi tidak melebihi 10% dari total populasi US EPA, 2002).

3.6. Uptake dan Depurasi

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental yang terbagi menjadi dua langkah utama yakni langkah pertama adalah memaparan ikan dengan logam berat Cr dan Pb (uptake) dalam jangka waktu selama 30 hari untuk mengetahui konsentrasi logam yang diserap masuk ke dalam tubuh ikan (proses uptake) dan langkah selanjutnya adalah menganalisis hasil depurasi yang dilakukan oleh ikan selama 12 hari.

Pada tahap uptake, ikan dipaparkan dengan logam Pb dan Cr selama 30 hari dengan konsentrasi logam masing-masing adalah 1 mg/L. *Stock sollution* yang digunakan dalam penelitian ini dibuat menggunakan $Pb(NO_3)_2$ dan $K_2Cr_2O_7$ yang dilarutkan dengan air bersih *(tap water)* yang berasal dari Laboratorium Kualitas Air, Teknik Lingkungan UII. Masa uptake dapat dilakukan selama 28 hari kecuali jika keseimbangan telah tercapai lebih awal (OECD, 1996). Pemilihan durasi uptake pada penelitian ini juga berdasarkan pertimbangan lainnya yakni terbatasnya waktu penelitian untuk tugas akhir sehingga durasi uptake yang dipilih dalam penelitan ini adalah selama 30 hari.

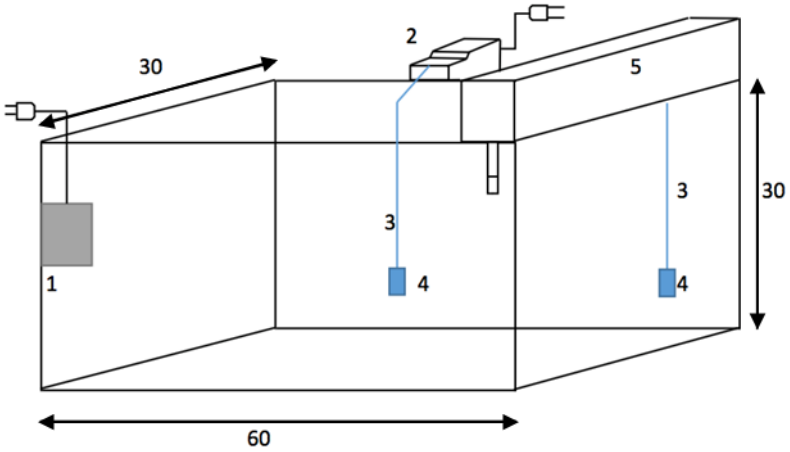
Reaktor menggunakan sistem semi-statis dengan air yang diperbarui dan dilakukan secara duplo. Pengujian semi statis merupakan cara pengujian yang tidak

menggunakan aliran air melainkan melakukan pergantian air secara keseluruhan atau pada volume tertentu dengan jangka waktu yang telah ditetapkan, misalnya selama 24 jam. Air yang digunakan sebagai media tidak boleh digunakan selama lebih dari 14 hari karena kemungkinan terjadinya penumpukan bakteri, jamur, atau pertumbuhan lendir alga dan masalah-masalah lainnya. (US EPA, 2002).

Volume air yang digunakan untuk reaktor Bak A dan Bak B (yang diberi perlakuan) adalah 25 liter pada Bak A dan Bak B dan 20 liter pada Bak Kontrol. Air yang digunakan sebagai pelarut bahan kimia pada ketiga bak tersebut adalah *tap water* yang bersih yang berasal dari Laboratorium Teknik Lingkungan FTSP UII. Dalam penelitian ini, air diganti setiap enam hari sebanyak 80% dari volume air yang digunakan. Hal ini dilakukan agar selain untuk melihat akumulasi logam yang terjadi, juga untuk meminimalisir limbah yang dihasilkan serta menjaga agar air yang digunakan tetap bersih. Agar kualitas air tetap terjaga, air diganti setiap enam hari sekali.

Menurut US EPA (2002) sistem semi-statis ini memiliki beberapa kelebihan dan kekurangan, antara lain :

a) Kelebihan sistem semi-statis
    1. Menurunkan kemungkinan berkurangnya DO akibat tingginya BOD dan/atau COD atau efek buruk dari sisa metabolisme organisme dalam larutan uji.
    2. Menurunkan kemungkinan kehilangan polutan melalui penguapan dan/atau adsorpsi ke pembuluh yang terpapar.
    3. Dapat memberikan energi terhadap hewan uji ketika larutan uji diperbarui, dan akan mempertahankan kondisi hewan uji yang lebih sehat.
b) Kekurangan sistem semi-statis
    1. Membutuhkan volume efluen yang lebih besar daripada pengujian dengan sistem/aliran yang tidak diperbarui.
    2. Umumnya lebih sedikit kemungkinan variasi sementara dalam sifat limbah.



Gambar 3.2 Desain Reaktor

Keterangan :

1. Pompa
2. Aerator
3. Selang
4. Batu gelembung udara
5. Filter

Selama masa uptake dan depurasi pemantauan terhadap syarat-syarat kualitas air saat perlakuan terhadap ikan juga dilakukan yakni dengan melakukan pengukuran terhadap pH, suhu dan konsentrasi oksigen terlarut (DO) di dalam air dan pemantauan terhadap mortalitas ikan. Pengukuran ketiga parameter tersebut dilakukan setiap hari agar kualitas air dapat tetap dijaga. Pengukuran pH menggunakan pH meter. Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan termometer dan pengukuran terhadap DO menggunakan DO meter. Ketiga alat tersebut telah tersedia di Laboratorium Kualitas Air, Teknik Lingkungan UII dan telah di kalibrasi. Pengukuran ketiga parameter tersebut dilakukan dengan cara dicelupkan secara langsung masing-masing alat ukur ke dalam air yang digunakan. Sama halnya dengan saat masa aklimatisasi, ketiga parameter tersebut harus sesuai dengan standar kualitas air untuk budidaya ikan nila berdasarkan SNI 6141:2009. Selain itu, pemantauan terhadap mortalitas ikan juga dilakukan setiap hari dan langsung mengeluarkan ikan yang mati dari dalam akuarium untuk mencegah terjadinya penyebaran penyakit.

Interval waktu pengambilan sampel uptake dilakukakan setiap 6 hari sekali. Penentuan interval pengambilan sampel saat adalah opsional (OECD,1996). Beberapa penelitian menggunakan interval waktu setiap 7 hari selama 28 hari. Dikarenakan penelitian ini dilakukan selama 30 hari, maka pengambilan sampel dilakukan setiap 6 hari pada hari ke-0, 6, 12, 18, 24, dan 30 agar mendapatkan jumlah sampel yang lebih banyak dan lebih akurat. Menurut US EPA (2002) syarat berhasilnya tahap uptake ini, ketika parameter kualitas air terpenuhi dan ikan yang bertahan hidup adalah 90% total populasi.

Sampling (proses uptake) ikan yang diberi perlakuan dilakukan secara duplo dan sampling ikan kontrol diambil sebanyak 1 ekor setiap 6 hari. Demikian juga dengan sampel air yang digunakan sebagai media pemeliharaan ikan. Analisis konsentrasi logam Pb dan Cr pada sampel ikan mengacu SNI 2354.5:2011 tentang Penentuan kadar logam berat Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) pada produk perikanan sedangkan analisis konsentrasi logam Pb di air mengacu pada SNI 06-6989.8-2004 cara uji timbal (Pb) dan pengujian Cr mengacu pada SNI 6989.17:2009 cara uji kromium total (Cr-T). Pengujian logam timbal (Pb) dan (Cr) pada daging ikan dan di air dilakukan deteksi menggunakan AAS *(Atomic Absorption Spectrofotometry).*

Setelah proses uptake selesai dilakukan, selanjutnya dilakukan proses depurasi untuk melihat berapa konsentrasi logam yang tersisa di tubuh ikan selama ±14 hari (EPA, 2002). Berbeda dengan proses uptake, pada proses depurasi ikan hanya ditempatkan pada air bersih (*tap water*) yang tidak terdapat kandungan logam Pb dan Cr-nya. Pada tahap depurasi ikan yang digunakan adalah ikan sisa yang masih bertahan hidup setelah melalui masa uptake. Ikan ditempatkan pada akuarium yang sama dengan akuarium yang digunakan pada saat masa depurasi namun harus dipastikan bahwa akuarium tersebut telah dicuci bersih dan tidak terdapat sisa logam agar tidak terjadi kontaminasi. Demikian juga dengan alat-alat pelengkap lainnya seperti filter, pompa dan aerator.

Durasi waktu yang digunakan pada masa depurasi dalam penelitian adalah selama 12 hari. Dengan sampling ikan dan air dari bak yang diberi perlakuan

masing-masing dilakukan duplo dan satu sampel untuk ikan kontrol dan air kontrol. Sampling dilakukan dengan jarak waktu setiap 3 hari sekali yakni pada hari ke-3, 6, 9 dan 12. Pemilihan durasi waktu tersebut didasari oleh pertimbangan bahwa berdasarkan fakta, masyarakat cenderung memilih untuk mengolah dan mengonsumsi ikan nila dengan segera setelah diperoleh tanpa melakukan depurasi terlebih dahulu terhadap ikan tersebut. Sehingga jarak waktu yang dipilih tersebut diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kemampuan ikan dalam mendepurasi logam dari dalam tubuhnya dengan waktu yang tidak begitu lama sehingga ikan yang dikonsumsi tidak berbahaya. Selama proses uptake dan depurasi ikan diberi makan secukupnya sebanyak tiga kali sehari.

3.7. Analisis Logam pada Sampel Ikan dan Air

Pengujian kandungan logam timbal (Pb) dan kromium (Cr) pada ikan yang mengacu pada SNI 2354.5:2011. Setelah mengambil sampel ikan yang akan dianalisis, ikan selanjutnya dibedah untuk diambil bagian dagingnya. Pemilihan daging sebagai sampel yang dianalisis didasari oleh fakta bahwa setiap orang yang memilih ikan sebagai makanannya akan mengonsumsi daging

Sampel daging ikan diambil kemudian ditimbang berat awalnya dan dimasukkan ke dalam *furnace* dengan suhu 450°C selama ±18 jam untuk memperoleh sampel kering. Setelah kering, sampel daging ikan tersebut berubah menjadi abu yang berwarna putih yang disebut sebagai sampel kering. Sampel kemudian di timbang dan di destruksi menggunakan HCl 6 M dan HNO_3 0,1 M untuk kemudian dilakukan pembacaan AAS *(Atomic Absorption Spectrofotometry*) untuk mengetahui konsentrasi logam Pb dan Cr yang diserap oleh ikan ke dalam tubuhnya.

Analisis logam Pb dan Cr yang terdapat di air dilakukan berdasarkan SNI 06-6989.8-2004 dan SNI 6989.17:2009. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 100-250 ml kemudian ditambahkan dengan 5-10 ml HNO_3 dan selanjutnya didestruksi hingga sampel tersisa ±10 ml kemudian disaring dan ditambahkan aquades hingga 25 ml.

3.8. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara komparatif deskriptif dengan membandingkan kosentrasi logam masing-masing logam Pb dan Cr di ikan yang diberi perlakuan dan ikan kontrol dengan konsentrasi logam di air yang diberi perlakuan dan kontrol, membandingkan serta melihat hubungan antara konsentrasi logam yang terdapat pada daging ikan dengan pertumbuhan ikan serta melakukan evaluasi nilai akumulasi logam pada ikan berdasarkan perhitungan BCF (*Bioconcentration Factor*).

3.9. BCF (*Bioconcentration Factor*)

BCF dapat dihitung sebagai rasio konsentrasi kimia dalam organisme dan konsentrasi kimia dalam air pada kondisi tunak. BCF juga dapat ditentukan secara kinetik sebagai rasio konstanta laju penyerapan bahan kimia dari air dan konstanta laju eliminasi atau laju depurasi total. Perhitungan BCF dilakukan untuk mengetahui kemampuan ikan dalam mengakumulasi logam. Perhitungan nilai BCF dapat menggunakan rumus berikut.

$$BCF = \frac{C_{org}}{C}$$

Keterangan :

C_{org} : Konsentrasi logam berat dalam organisme (mg/kg atau ppm)

C : Konsentrasi logam berat dalam air (ppm)