

III. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2015 bertempat di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Kandungan lemak total diuji di Laboratorium Analisis Politeknik Negeri Lampung, dan uji kandungan nitrat dan ortofosfat dilakukan di Laboratorium Penguji Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL), Lampung.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Biota Kultur

Biota kultur yang digunakan dalam penelitian adalah *Nitzschia* sp. yang dikultur pada skala Lab di Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

3.2.2 Media Kultur

Media yang dipergunakan dalam kultur *Nitzschia* sp. adalah air laut dengan salinitas 29 ppt dan pupuk standar *Conway* sebagai sumber nutrisi (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi pupuk *Conway* (BBPBL Lampung, 2015).

No	Bahan Kimia	Takaran Per Liter
1	Aquabides	700 ml
2	EDTA	45 gram
3	FeCl ₃	1,3 gram
4	H ₃ BO ₃	33,6 gram
5	NaH ₂ PO ₄	20 gram
6	MnCl ₂	0,5 gram
7	NaNO ₃	100 gram
8	<i>Trace metal solution</i>	1 cc
	ZnCl ₂	2,1 gram
	CoCl ₂	2 gram
	CuSO ₄	2 gram
	(NH ₄)MO ₇	0,9 gram
	Distilled	100 ml
9	Aquabides	Ditambahkan hingga 1 liter

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Penelitian menggunakan beberapa alat untuk mendukung jalannya penelitian. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Alat	Jumlah
1	Selang dan Batu Aerasi	9 buah
2	<i>Whatman Paper</i>	1 lembar
3	Spektrofotometer	1 buah
4	Tabung Erlenmeyer	1 buah
5	pH <i>Paper</i>	1 kotak
6	Lampu TL 36 watt	3 buah
7	Termometer	1 buah
8	<i>Plastic Wrap</i>	1 gulung
9	Cawan Petri	9 buah
10	Botol Film	10 buah
11	Akuarium 4,5 L	9 buah
12	Gelas Ukur	1 buah
13	Pipet Tetes	10 buah
14	Corong	9 buah
15	<i>Hand Refractometer</i>	1 buah
16	Panci	1 buah
17	Aluminium Foil	1 gulung
18	Kain Satin	1 meter
19	<i>Haemocytometer</i>	1 buah
20	Mikroskop	1 buah

3.3.2 Bahan

Penelitian menggunakan beberapa bahan untuk melaksanakan penelitian. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah air laut steril, pupuk *Conway*, silikat dan NaOH.

3.4 Rancangan Penelitian

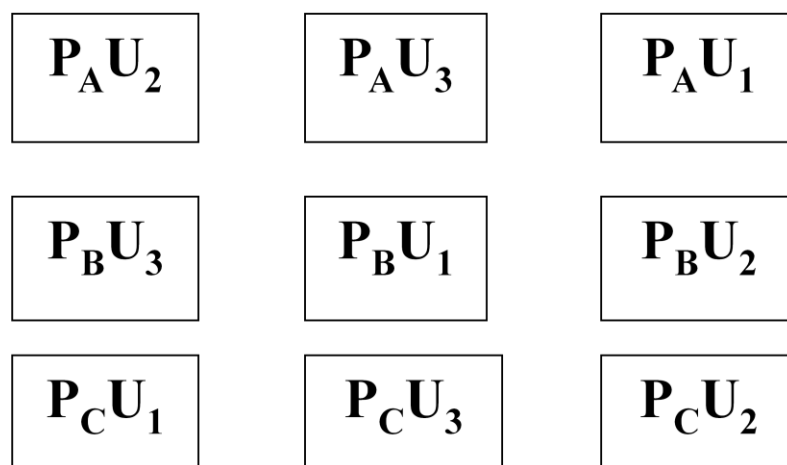
Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

Perlakuan A : Lama penyinaran (fotoperiode) 6 jam terang dan 18 jam gelap selama kultur *Nitzchia* sp..

Perlakuan B : Lama penyinaran (fotoperiode) 12 jam terang dan 12 jam gelap selama kultur *Nitzchia* sp..

Perlakuan C : Lama penyinaran (fotoperiode) 18 jam terang dan 6 jam gelap selama kultur *Nitzchia* sp..

Penghitungan kepadatan dan analisis lemak total dilakukan pada akhir fase eksponensial. Penempatan wadah kultur dilakukan secara acak disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Tata letak wadah kultur *Nitzschia* sp..

Keterangan:

P_A : Kultur *Nitzchia* sp. (fotoperiode 6 jam terang dan 18 jam gelap)

P_B : Kultur *Nitzchia* sp. (fotoperiode 12 jam terang dan 12 jam gelap)

P_C : Kultur *Nitzchia* sp. (fotoperiode 18 jam terang dan 6 jam gelap)

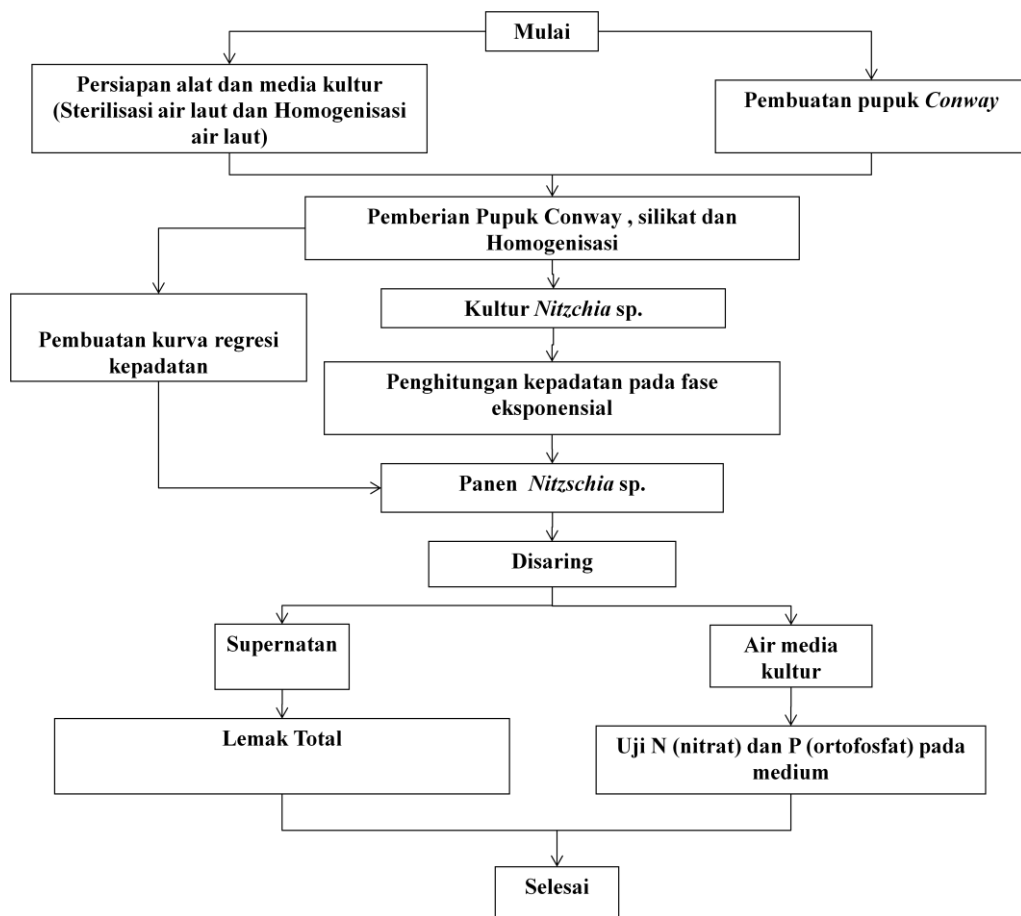
U₁ : Ulangan pertama

U₂ : Ulangan kedua

U₃ : Ulangan ketiga

3.5 Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan pada skala laboratorium. Persiapan penelitian dimulai dengan sterilisasi alat dan air yang akan digunakan selama penelitian. Prosedur penelitian disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Tahapan alur penelitian.

3.5.1 Persiapan

Tahap awal yang dilakukan adalah mempersiapkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Alat dan bahan yang digunakan untuk kultur *Nitzschia* sp. harus dalam keadaan steril agar tidak terjadi kontaminasi dengan organisme lain yang dapat menjadi kompetitor bagi *Nitzschia* sp..

a. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat kultur seperti akuarium dan cawan petri dicuci dengan cara direndam menggunakan air kaporit ± 24 jam, dibilas dengan air tawar, dicuci menggunakan sabun lalu dibilas menggunakan air tawar diulang dua kali untuk mencegah protozoa. Alat-alat kultur yang telah dibilas disemprot dengan alkohol 70%. Sedangkan untuk selang dan batu aerasi, setelah direndam air kaporit, dicuci, dibilas dengan air tawar, lalu direndam dan direbus selama 15 menit.

b. Sterilisasi air

Air laut yang akan digunakan disterilisasi melalui beberapa tahapan. Tahapan pertama adalah ozonisasi. Air laut, disterilisasi dengan cara air dididihkan selama 30 menit selanjutnya air didinginkan kemudian disaring. Selanjutnya dididihkan dan disaring untuk kedua kalinya untuk memastikan tidak ada pesaing predator (terutama protozoa) yang akan mempengaruhi keberhasilan kultur fitoplankton.

c. Pembuatan pupuk Conway

Pupuk Conway yang digunakan pada kultur *Nitzschia* sp. skala laboratorium yaitu pupuk Conway PA (Pro Analisis) yang memiliki kemurnian bahan mencapai 100%. Pemberian pupuk pada kultur *Nitzschia* sp. sebanyak 2 ml/l media kultur. Pembuatan pupuk Conway untuk stok (Muhaemin, 2009) yaitu:

1. Bahan pembuatan pupuk *Conway* disiapkan dan ditimbang menggunakan timbangan digital sesuai takaran (Tabel 1), disiapkan juga alat seperti, pipet tetes, gelas baker dan sendok.
2. Setelah semua bahan ditimbang, aquabides dimasukkan ke dalam gelas baker sebanyak 700 ml, kemudian bahan-bahan pupuk *Conway* dimasukkan secara berurutan mulai dari EDTA sampai NaNO_3 (Tabel 1) dan diaduk hingga larut.
3. Dimasukkan bahan *trace metal solution* (Tabel 1) dan dilarutkan satu persatu.
4. Setelah semua larut, ditambahkan lagi aquabides ke dalam larutan pupuk hingga menjadi 1 liter.

3.5.2 Penelitian Pendahuluan

Sebelum penelitian, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan untuk memperoleh data kepadatan dari masing-masing perlakuan yang akan diteliti. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu:

1. Akuarium disusun pada bagian bawah meja secara acak. Pencahayaan yang digunakan berasal dari lampu TL 36 watt sebanyak 3 buah, sebagai sumber cahaya di setiap meja.
2. Air laut steril dimasukkan ke dalam akuarium dan dihomogenisasi dengan aerasi kuat. Akuarium ditutup plastik tembus pandang (mica) pada bagian atas.
3. Pupuk *Conway* dimasukkan ke dalam akuarium kultur sebanyak 3 ml/liter air dan tambahkan larutan silikat sebanyak 1 ml/liter air, dihomogenisasi kembali dengan aerasi kuat.
4. Bibit *Nitzschia* sp. dimasukkan ke dalam akuarium dengan kepadatan awal $\pm 0,25 \times 10^8$ sel/ml sebanyak 220 ml/akuarium.

5. Kualitas air diukur pada akhir fase eksponensial.
6. Penghitungan kepadatan *Nitzschia* sp. menggunakan spektrofotometer dengan *optical density* (OD) 650 nm (Kusmiati dan Malik, 2002).
7. Penghitungan kepadatan *Nitzschia* sp. dilakukan setiap 3 jam sekali mulai dari awal hingga didapatkan waktu akhir fase eksponensial.
8. Kultur *Nitzschia* sp. dipanen total dengan cara penambahan NaOH sebanyak 10 ml/volume kultur dan disaring menggunakan kain satin. Tiap sampel disimpan dalam cawan petri dan ditutup dengan *plastic wrap* sedangkan air dari penyaringan dimasukkan ke dalam botol.

3.5.3 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan untuk memperoleh data dari masing-masing perlakuan yang akan diteliti. Prosedur kultur yang dilakukan yaitu :

1. Akuarium kultur disusun pada bagian bawah meja dengan susunan secara acak. Pencahayaan yang digunakan berasal dari lampu TL 36 watt sebanyak 3 buah, sebagai sumber cahaya si setiap meja (Gambar 8.)



Gambar 8. Tata letak akuarium dan pencahayaan lampu 36 watt selama kultur *Nitzschia* sp.

2. Air laut steril dimasukkan ke dalam akuarium dan dihomogenisasi dengan aerasi kuat. Akuarium diberi tutup berupa plastik tembus pandang (mica) pada bagian atas.
3. Pupuk *Conway* di masukkan ke dalam akuarium kultur sebanyak 3 ml/liter air dan tambahkan larutan silikat sebanyak 1 ml/liter air kemudian, dihomogenisasi kembali dengan aerasi kuat.
4. Masukkan bibit *Nitzschia* sp. ke dalam akuarium dengan kepadatan awal $\pm 0,25 \times 10^8$ sel/ml sebanyak 220 ml/akuarium
5. Kualitas air diukur pada akhir fase eksponensial.
6. Penghitungan kepadatan *Nitzschia* sp. menggunakan spektrofotometer dengan *optical density* (OD) 650 nm (Kusmiati dan Malik, 2002).
7. Kultur *Nitzschia* sp. dipanen total dengan cara penambahan NaOH sebanyak 10 ml/volume kultur dan disaring menggunakan kain satin. Tiap sampel disimpan dalam cawan petri dan ditutup dengan *plastic wrap* sedangkan air dari penyaringan dimasukkan ke dalam botol.

3.6 Parameter yang Diteliti

3.6.1 Kepadatan *Nitzschia* sp.

Kepadatan fitoplankton dihitung menggunakan spektrofotometer. Menurut penelitian Muhaemin *et al.* (2009), spektrofotometer yang optimal dalam pengukuran kepadatan fitoplankton adalah *optical density* (OD) 650 nm. Cara menghitung kepadatan *Nitzschia* sp. adalah sebagai berikut:

1. Sampel bibit kultur diambil sebanyak 3 ml dan di masukkan ke dalam cuvet, kemudian dilihat nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer.

2. Sampel diambil setiap 3 jam sekali mulai dari awal penelitian hingga akhir fase eksponensial.
3. Hasil dari kepadatan pada pengamatan dikonversikan dengan nilai regresi linier absorbansi spektrofotometer (\AA) dalam kepadatan sel *Nitzschia* sp. yang didapatkan.

3.6.2 Kandungan Lemak

Uji proksimat lemak dilakukan di Laboratorium Analisis Politeknik Negeri lampung menggunakan metode Soxhlet. Prinsip Soxhlet ialah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, sehingga diharapkan terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik. Soxhlet terdiri dari pengaduk atau granul antibumping, still pot (wadah penyuling, bypass sidearm, thimble selulosa, extraction liquid, syphon arm inlet, syphon arm outlet, expansion adapter, condenser (pendingin), cooling water in, dan cooling water out (Darmasih, 1997).

Metode Soxhlet dipilih karena pelarut yang digunakan lebih sedikit (efisiensi bahan) dan larutan sari yang dialirkan melalui sifon dalam labu. Hal tersebut menyebabkan pelarut yang digunakan untuk mengekstrak sampel selalu baru, meningkatkan laju ekstraksi dan waktu yang digunakan lebih cepat. Kerugian pada metode ini ialah pelarut yang digunakan (harus) mudah menguap (Oktavia, 2013).

Berikut prosedur penentuan kadar lemak dan minyak (Metode Soxhlet).

- a. Sampel kering/padat yang telah dihaluskan ditimbang dengan teliti, dibungkus dengan kertas saring, dan dimasukkan dalam tabung ekstraksi Soxhlet.

- b. Air pendingin dialirkan melalui kondensor.
- c. Tabung ekstraksi dipasang pada alat distilasi Soxhlet dengan pelarut secukupnya. Ekstraksi dilakukan selama 4-5 jam.
- d. Cawan yang berisi lemak dikeringkan pada oven dengan suhu 100-105°C selama 30 menit.
- e. Berat residu dalam cawan lemak dinyatakan sebagai berat lemak dan minyak, dengan rumus:

$$\% \text{ Lemak} = \left(\frac{B-C}{A} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

A = Berat Contoh (gr)

B = Cawan + Lemak (gr)

C = Cawan kosong (gr)

3.6.3 Rasio N P (BBPBL, 1988)

3.6.3.1 Kandungan Nitrat (NO_3^-)

Reagen untuk uji kandungan nitrat pada media dibuat dengan metode dari BBPBL adalah sebagai berikut:

a. Pembuatan Reagen

- 1) Sebanyak 0,5 gram sodium arsenit (NaAsO_2) dilarutkan dengan aquades menjadi 50 ml.
- 2) Sebanyak 5 g Brucine ($\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$) dilarutkan dengan asam asetat glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) menjadi 100 ml.
- 3) Sebanyak 125 ml asam Sulfat (H_2SO_4) pekat ditambah 31,25 ml aquades.

Pengukuran kandungan nitrat dalam media kultur dilakukan pada akhir fase eksponensial menggunakan spektrofotometer. Cara pengujian nitrat adalah sebagai berikut:

1. Sampel disaring dengan menggunakan *whatman paper* lalu diambil sebanyak 5 ml lalu dimasukkan ke dalam baker glass 50 ml.
2. Ditambahkan 1 tetes sodium arsenit dan 0,25 ml brucine.
3. Larutan diaduk dan didiamkan selama 10 menit.
4. Setelah 10 menit dalam suhu ruang, sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 410 nm.
5. Nilai *Absorbance* yang terbaca pada tampilan layar spektrofotometer bersatuan mg/l.

3.6.3.2 Kandungan ortofosfat (PO_4)³⁻

Reagen untuk uji kandungan ortofosfat pada media dibuat dengan metode dari BBPBL adalah sebagai berikut:

- a. Pembuatan Reagen
 - 1) Sebanyak 1,25 gram $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan ke dalam 50 ml gliserol dan dipanaskan dalam “waterbath”.
 - 2) a. Sebanyak 2,5 gram ammonium molibdate $\{(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}\}$ dilarutkan ke dalam 17,5 ml aquades.
b. Sebanyak 28 ml asam sulfat (H_2SO_4) ditambahkan dengan 40 ml aquade, tunggu beberapa saat pada suhu ruang.
c. Larutan a dan b dicampurkan dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquades hingga mencapai garis pada leher labu ukur. Kemudian larutan disimpan dalam botol gelap.

Uji kandungan ortofosfat dilakukan pada akhir fase eksponensial dengan menggunakan spektrofotometer. Cara pengujian nitrat adalah sebagai berikut:

1. Sampel disaring dengan menggunakan *whatman paper* lalu diambil sebanyak 25 ml lalu dimasukkan ke dalam baker glass 50 ml.
2. Ditambahkan 1 ml ammonium molibdate dan 5 tetes larutan SnCl_2 .
3. Larutan diaduk dan didiamkan selama 10 menit.
4. Setelah 10 menit dalam suhu ruang, sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 690 nm.
5. Nilai *Absorbance* yang terbaca pada tampilan layar spektrofotometer dimasukkan dalam grafik untuk dibaca nilai konsentrasinya.

3.6.4 Pembuatan Kurva Standar Absorbansi Sel *Nitzschia* sp.

Pengukuran kepadatan dibuat dengan menggunakan hubungan regresi linier antara kepadatan *Nitzschia* sp. dan absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer. Menurut penelitian Muhaemin (2009), panjang gelombang spektrofotometer yang optimal dalam pengukuran kepadatan fitoplankton adalah sebesar 650 nm. Menurut (Muhaemin *et al.*, 2014) cara mencari regresi linier tersebut adalah sebagai berikut:

1. Siapkan air laut steril yang telah di saring dengan menggunakan kertas saring *whatman paper*.
2. Sampel dimasukkan ke dalam botol film, diencerkan sebanyak 20 ml menggunakan air laut steril dengan selang sampel yang digunakan adalah 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, dan 2 ml.
3. Masukkan sampel yang telah diencerkan ke dalam cuvet untuk dihitung nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dan dicatat nilai absorbansinya.

4. Sampel selanjutnya diamati kepadatannya di bawah mikroskop dengan menggunakan *haemocytometer*. Pengamatan dilakukan terus menerus pada tiap pengenceran.
5. Nilai absorbansi dan nilai perhitungan dari *haemocytometer* yang telah didapat, kemudian dibuat kurva absorbansi untuk menentukan nilai kepadatan *Nitzschia* sp..

3.7 Analisis Data

Koefisien regresi secara individual diuji dengan menggunakan uji t (t-test) untuk membandingkan dua nilai tengah contoh bebas apabila $n_1 = n_2 = n$, dengan anggapan bahwa kedua populasi menyebar normal dan memiliki ragam sama yang tidak diketahui nilainya (Steel dan Torrie, 1993).

$$S^2 = \frac{\sum x_1^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n} + \sum x_2^2 - \frac{(\sum x_2)^2}{n}}{2(n-1)}$$

$$S_{x_1-x_2} = \sqrt{\frac{2S^2}{n}}$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{x_1-x_2}}$$

$$db = 2(n-1)$$

Keterangan:

X	= variabel independen	\bar{x}	= rata-rata sampel
Y	= variabel dependen	S^2	= ragam
a	= kemiringan kurva/slope	S	= simpangan baku
b	= <i>intercept</i>	db	= derajat bebas
n	= jumlah sampel		
t	= Koefisien t		