

III. METODOLOGI

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 1 sampai 30 juli 2014 bertempat di Laboratorium Jurusan Budidaya Perairan Universitas Lampung. Uji protein dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Politeknik Negeri Lampung, sedangkan analisis kandungan Nitrat dilaksanakan di Laboratorium Kualitas Air Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Laut (BBPBL), Lampung

B. Materi Penelitian

B.1 Biota Uji

Biota uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Tetraselmis* sp. yang dikultur dengan skala laboratorium di BBPBL Lampung dengan kelimpahan awal 1×10^5 sel/ml.

B.2 Media Uji

Media yang dipergunakan dalam kultur *Tetraselmis* sp. berbentuk cair atau larutan yang tersusun dari senyawa kimia (pupuk) yang merupakan sumber nutrien. Pupuk yang digunakan dalam penelitian adalah Conwy. Komposisi pupuk Conwy

yang digunakan adalah komposisi pupuk standar dan komposisi pupuk dengan kandungan NaNO_3 sebanyak 50 gram/l (Tabel 1 dan 2).

Tabel 1. Komposisi pupuk *Conwy* skala laboratorium (BBPBL Lampung)

No	Bahan Kimia	Takaran Per Liter
1	EDTA	45 gram
2	FeCl_3	1,3 gram
3	H_3BO_3	33,6 gram
4	NaH_2PO_4	20 gram
5	NaNO_3	100 gram
6	<i>Trace metal solution</i>	1 cc
	ZnCl_2	2,1 gram
	CoCl_2	2 gram
	CuSO_4	2 gram
	$(\text{NH}_4)_6$	0,9 gram
	Distilled	100 ml
7	Aquadest	hingga 1 liter

Tabel 2. Komposisi pupuk *Conwy* dengan pengurangan NaNO_3 skala laboratorium

No	Bahan Kimia	Takaran Per Liter
1	EDTA	45 gram
2	FeCl_3	1,3 gram
3	H_3BO_3	33,6 gram
4	NaH_2PO_4	20 gram
5	NaNO_3	50 gram
6	<i>Trace metal solution</i>	1 cc
	ZnCl_2	2,1 gram
	CoCl_2	2 gram
	CuSO_4	2 gram
	$(\text{NH}_4)_6$	0,9 gram
	Distilled	100 ml
7	Aquadest	hingga 1 liter

C. Alat dan Bahan Penelitian

C.1 Alat

Penelitian menggunakan beberapa alat untuk mendukung jalannya penelitian.

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3. Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Alat	Jumlah
1	Aquarium ukuran 3 L	20 buah
2	Selang dan batu aerasi	20 buah
3	Kertas <i>Whatman</i>	-
4	Spektrofotometer Genesys 20	1 buah
5	Erlenmeyer	12 buah
6	Rak kultur	1 buah
7	pH <i>paper</i> skala 0-14	1 kotak
8	Thermometer °C	1 buah
9	<i>plastic wrap</i>	1 gulung
10	Cawan petri	12 buah
11	Botol film	48 buah
12	<i>Beaker Glass</i>	8 buah
13	Corong	8 buah
14	Pipet tetes	4 buah
15	Gelas ukur	1 buah
16	Lampu TL 36 watt	4 buah

C.2 Bahan

Penelitian menggunakan beberapa bahan untuk mendukung penelitian. Bahan

- bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut

Tabel 4. Bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Bahan	Jumlah
1	Bibit <i>Tetraselmis</i> sp.	1-2 x10 ⁵ sel/ml
2	Air laut steril	-
3	Pupuk Conwy	-

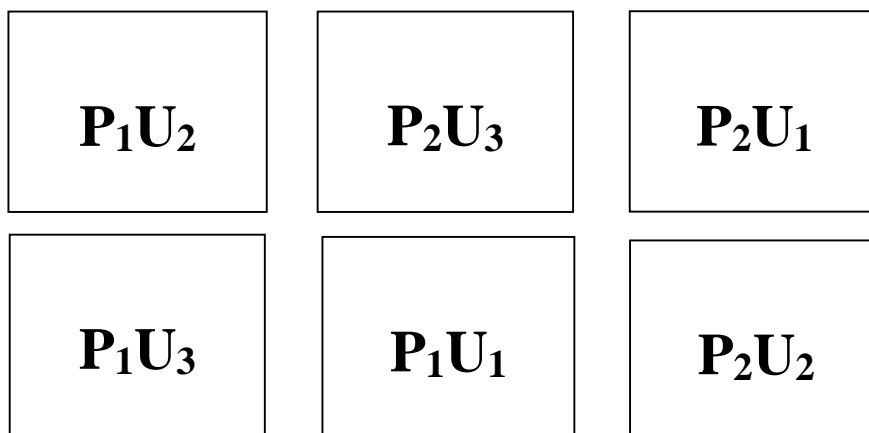
D. Rancangan Penelitian

Penelitian terdiri dari 2 perlakuan, masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

Perlakuan 1 : kultur *Tetraselmis* sp. dengan kadar NaNO₃ pada pupuk *Conwy* sebanyak 100 gram/l

Perlakuan 2 : kultur *Tetraselmis* sp. dengan kadar NaNO₃ pada pupuk *Conwy* sebanyak 50 gram/l

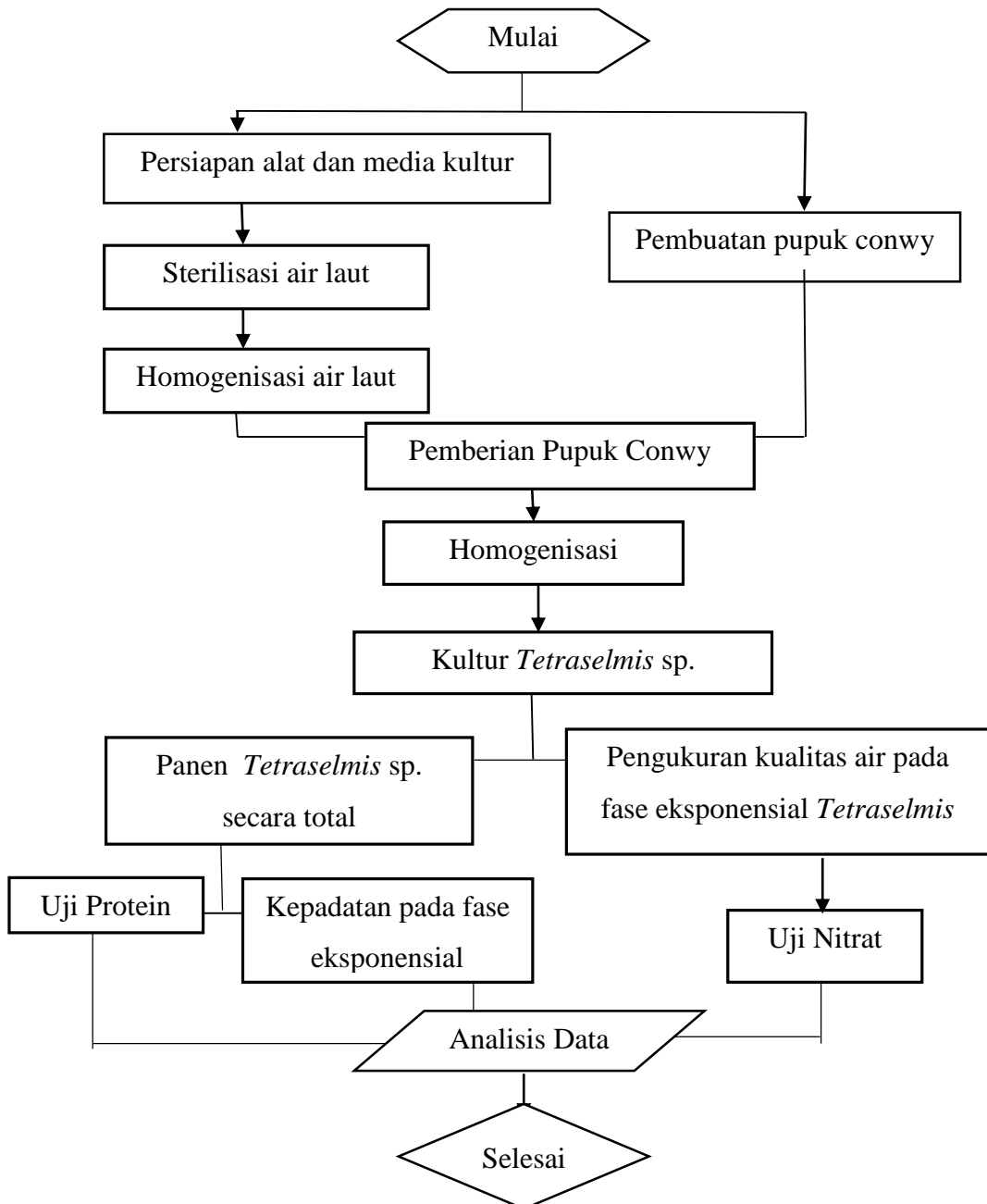
Waktu pengambilan sampel kandungan nitrat, kepadatan *Tetraselmis* sp. Dan protein dilakukan pada pada jam kultur ke- 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48. Peletakan wadah kultur dilakukan secara acak disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Tata letak wadah kultur *Tetraselmis* sp.

E. Prosedur Penelitian

Tahapan yang dilakukan selama penelitian mengenai pemanfaatan nitrat anorganik pada fase eksponensial *Tetraselmis* sp. dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Tahapan alur penelitian

E.1 Persiapan

Tahap awal yang dilakukan adalah persiapan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Alat dan bahan yang digunakan untuk kultur *Tetraselmis* sp. harus dalam keadaan steril.

a. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat kultur seperti akuarium dan cawan petri dilakukan dengan merendam alat-alat tersebut menggunakan larutan kaporit 100 ppm selama 1 hari. Selanjutnya alat-alat tersebut dicuci menggunakan sabun pencuci piring, lalu dibilas menggunakan air tawar. Alat-alat kultur yang telah dibilas disemprot dengan alkohol 70%. Sedangkan untuk proses sterilisasi selang dan batu aerasi, setelah direndam kaporit, dicuci, dibilas dengan air tawar, dan direbus selama 15 menit.

b. Sterilisasi air

Sterilisasi air laut yang akan digunakan diawali dengan penyinaran *ultraviolet* dan *ozonisasi*. Setelah diberi ozon, air yang akan digunakan dididihkan 2 kali (masing-masing 30 menit) untuk memastikan tidak ada organisme kontaminan (terutama protozoa) yang akan mempengaruhi kultur fitoplankton. Setelah dingin, air tersebut disaring menggunakan plankton net berukuran 20 μ m, kemudian dimasukkan ke dalam wadah kultur,

E.2 Pelaksanaan Penelitian

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

1. Bibit disiapkan. Bibit diambil di BBPBL dengan kepadatan sekitar 1×10^5 sel/ml.

2. Pupuk diberikan sebanyak 1 ml/liter kultur
3. Kualitas air diukur setelah biota dibiakkan saat mencapai fase akhir lag atau pada fase awal eksponensial.
4. Pengamatan kepadatan *Tetraselmis* sp. dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan *Optical Density* (OD) 650 nm.
5. Kemudian kultur *Tetraselmis* sp. dipanen secara total dengan cara disaring dengan menggunakan kertas *whatman* sampai didapat sampel plankton segar. Tiap sampel disimpan ke dalam cawan petri dan ditutup dengan *plastic wrap*. Sedangkan air dari penyaringan berupa supernatan dimasukkan ke dalam botol film.
6. Setelah mencapai fase akhir eksponensial atau pada fase awal stasioner, dilakukan pengukuran kualitas air kembali.
7. Sampel yang telah disimpan dalam cawan petri dibawa untuk dilakukan uji protein.
8. Sampel berupa supernatan dilakukan uji nitrat.

F. Parameter yang Diamati

F.1 Penghitungan Kepadatan *Tetraselmis* sp.

Kepadatan *Tetraselmis* sp. dihitung dengan menggunakan spektrofotometer untuk memperoleh data kepadatan yang akan dianalisis untuk mengetahui hubungannya dengan kandungan protein total intraseluler *Tetraselmis* sp. Menurut penelitian Muhaemin (2008), panjang gelombang spektrofotometer yang optimal dalam pengukuran kepadatan fitoplankton adalah sebesar 650 nm. Cara menghitung kepadatan *Tetraselmis* sp. adalah sebagai berikut:

1. Wadah sampel dengan volume ± 50 ml disiapkan sebanyak 20 buah.
2. Masing-masing wadah diisi dengan *Tetraselmis* sp. Secara berurutan dengan volume 40, 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, dan 2 ml.
3. Masing-masing wadah yang telah diisi *Tetraselmis* sp. dengan volume tersebut diatas ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 40 ml.
4. Setelah pengenceran dilakukan, selanjutnya tingkat absorbansi sampel diamati dengan menggunakan spektrofotometer.
5. Prosedur no.4 dilakukan pula pada seluruh sampel yang tersedia dan masing-masing diulang sebanyak tiga kali kemudian diambil nilai rata-ratanya
6. Disaat yang sama dilakukan pula pengamatan kepadatan pada sampel tersebut dengan menggunakan mikroskop dan *haemocytometer*.
7. Hasil pengamatan pada prosedur no.5 selanjutnya diplotkan pada sumbu x pada kurva linier.
8. Hasil pengamatan pada prosedur no.6 diplotkan pada sumbu Y pada kurva linier.
9. Persamaan garis dihitung dengan menghitung koefisien kemiringan (a) dan intersep (b).
10. Setelah itu diperoleh persamaan garis $Y=ax+b$.
11. Perhitungan kepadatan sel *Tetraselmis* sp. selanjutnya cukup dengan mengukur nilai absorbansi saja.

12. Nilai absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke persamaan no.10 untuk mengganti nilai x sehingga diperoleh nilai kepadatan (Y).

F.2 Uji Kandungan Nitrat

Untuk menghitung kandungan nitrat dalam media hidup *Tetraselmis* sp. adalah dengan menggunakan spektrofotometer pada saat sebelum pupuk dimasukkan (N_{-1}), saat setelah pupuk dimasukkan (N_0), dan pada jam kultur ke- 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48. Uji kandungan nitrat dilakukan untuk memperoleh data kandungan nitrat yang dianalisis untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kepadatan dan kandungan protein total *Tetraselmis* sp. Cara pengujian nitrat adalah sebagai berikut:

1. Sampel berupa supernatan 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

F.3 Uji Protein

Uji protein dilakukan pada jam kultur ke- 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, sampel diuji di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Politeknik Negeri Lampung. dengan menggunakan metoda Gunning. Uji kandungan protein dilakukan untuk memperoleh data kandungan protein intraseluler *Tetraselmis* sp. yang akan dianalisis untuk mengetahui hubungannya dengan kepadatan *Tetraselmis* sp. dan

konsentrasi nitrat anorganik. Cara pengujian kandungan protein adalah sebagai berikut :

- Bahan ditimbang 0,5 – 1,0 gr dimasukkan dalam labu kjeldahl, ditambahkan 10 gr K_2S atau Na_2SO_4 anhidrat, dan 10 – 15 ml H_2SO_4 pekat. Kalau distruksi sukar dilakukan perlu ditambah 0,1 – 0,3 gr $CuSO_4$ dan di kocok
- Kemudian dilakukan distruksi diatas pemanas listrik dalam lemari asam, mula mula dengan api kecil, setelah asap hilang api dibesarkan, pemanasan diakhiri setelah cairan menjadi jernih tak berwarna lagi
- Dibuat perlakuan blangko, yaitu seperti perlakuan diatas tanpa contoh.
- Setelah dingin tambahkan kedalam labu kjeldahl aquades 100 ml, serta larutan $NaOH$ 45% sampai cairan bersifat basis, pasanglah labu kjeldahl dengan segera pada alat distilasi.
- Labu Kjeldahl dipanaskan sampai amonia menguap semua, distilat ditampung dalam erlenmeyer berisi 25 ml HCL 0,1N yang sedang diberi indikator PhenolPtalein 1 % beberapa tetes. Distilasi diakhiri setelah distilat tertampung sebanyak 150 ml atau setelah distilat yang keluar tak bersifat basis.
- Kelebihan HCl 0,1 N dalam distilat dititrasi dengan larutan basa standar (larutan $NaOH$ 0,1 N)
- Perhitungan kandungan protein dalam sampel dihitung menggunakan rumus:

$$\% N = \frac{(\text{ml NaOH blanko} - \text{ml NaOH contoh}) \times N \text{ NaOH} \times 14,008}{\text{gr. Contoh} \times 10}$$

$$\% \text{ Protein} = \% N \times \text{Faktor Konversi}$$

Keterangan:

Faktor Konversi = 6,25 (setara dengan 0,16 gram nitrogen per gram protein)

F.4 Kualitas air (oksigen terlarut, pH, dan suhu media kultur)

Kualitas air dikondisikan dalam kondisi yang optimal untuk pertumbuhan *Tetraselmis* sp. Pengukuran oksigen terlarut, pH, dan suhu media menggunakan DO meter, pH meter, dan termometer. Pengukuran parameter tersebut dilakukan pada awal kultur (t_0) dan pada akhir kultur (t_{48}). Pengukuran kualitas air dilakukan pada setiap unit sampel. Data kualitas air digunakan sebagai data pendukung.

G. Analisis Data

Untuk menganalisa hubungan antara pemanfaatan nitrat anorganik dengan kandungan protein total, pengaruh konsentrasi nitrat anorganik terhadap kepadatan serta pengaruh kepadatan terhadap kandungan protein total pada fase eksponensial *Tetraselmis* sp. digunakan model persamaan regresi polinomial $Y = aX^2 + bX + c$, koefisien korelasi (r) Pearson (Walpole, 1992).

Koefisien korelasi merupakan tingkat hubungan antara dua variabel atau lebih yang menyatakan ada atau tidaknya hubungan diantara variabel-variabel yang bersangkutan dinyatakan dengan notasi (r). Nilai korelasi (r) dapat diartikan sebagai tingkat kekuatan hubungan antara dua variabel atau lebih (besarnya

kontribusi yang diberikan oleh variabel yang mempengaruhi), baik secara langsung maupun tidak langsung. Tingkat korelasi bernilai antara $-1 < r < 1$, dijelaskan bahwa jika r mendekati -1 nilai korelasi berlawanan yang artinya korelasi negatif. Jika r mendekati 1 , maka nilai korelasi searah yang artinya korelasi positif (Supangat, 2007).

Penentuan nilai korelasi menggunakan persamaan berikut (Walpole, 1992)

$$r = \frac{(n \sum xy) - (\sum x \sum y)}{\sqrt{[(n \sum x^2) - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

keterangan:

n = banyaknya sampel

X = variabel independen

Y = variabel dependen

Sedangkan analisis untuk membandingkan pengaruh tiap perlakuan adalah dengan menggunakan uji t (t-test). Uji t dilakukan 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).

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

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

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

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

Keterangan:

t = Koefisien t

\bar{x} = rata-rata sampel

S^2 = ragam

S = simpangan baku

n = jumlah sampel

db = derajat bebas