

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Hipotesis terhadap kandungan pigmen *Tetraselmis chuii*

H₀: Perlakuan salinitas tidak memberikan pengaruh terhadap kandungan pigmen mikroalga *T chuii*

H₁: Perlakuan salinitas memberikan pengaruh terhadap kandungan pigmen mikroalga *T chuii*

- b. Hipotesis terhadap biomassa *T chuii*

H₀: Perlakuan salinitas tidak memberikan pengaruh terhadap biomassa kering mikroalga *T chuii*

H₁: Perlakuan salinitas memberikan pengaruh terhadap biomassa kering mikroalga *T chuii*

Kaidah pengambil keputusan:

- Jika sig ($p < 0,05$) maka terima H₁ dan tolak H₀ ($\alpha = 0,05$)
- Jika sig ($p \geq 0,05$) maka tolak H₁ dan terima H₀ ($\alpha = 0,05$)

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Biota Uji

Biota yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga *T chuii* yang diperoleh dari stok murni Laboratorium Balai Besar

Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara sebanyak 2,5 liter dengan kepadatan awal stok 118×10^4 sel/mL.

3.2.2. Alat Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini disajikan pada

Tabel 1, antara lain:

Tabel 1. Alat Penelitian yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Nama Alat	Kegunaan
1	Alumunium foil	Membungkus alat dan sampel
2	Blower	Suplai udara
3	Cuvet	Tempat mengukur absorbansi
4	Botol 500 ml	Tempat kultur mikroalga
5	Gelas ukur	Mengukur volume air
6	<i>Hand Counter</i>	Alat bantu hitung
7	<i>Haemocytometer</i>	Menghitung kepadatan sel
8	Kain kasa steril	Menutup media kultur
9	Kertas label	Memberi label pada sampel
10	Lampu UV	Sterilisasi alat dan bahan
11	Mikroskop	Mengamati kepadatan sel
12	Mortar	Penghalus sampel
13	Plastik sampel	Menyimpan sampel
14	pH meter	Mengukur pH
15	Pipa plastik	Saluran udara
16	Pipet tetes	Mengambil sampel
17	Refraktometer	Mengukur salinitas
18	Selang aerasi	Suplai udara/saluran udara
19	Sentrifuge	Homogenitas sampel
20	Spatula	Pengambil ekstrak kering
21	Tabung reaksi	Tempat sampel
22	Toples plastik	Tempat media air laut/tawar steril

23	Thermometer air raksa	Mengukur suhu
24	Timbangan analitik	Menimbang sampel
25	Tisu	Membersikan alat
26	Vial	Menyimpan sampel
27	Vortex	Homogenitas sampel
28	DO meter	Mengukur parameter
29	<i>Filter pump</i> dan <i>Milipore</i>	Menyaring plankton
30	Autoklaf	Mensterilisasi media dan alat
31	Kulkas	Pendingin sampel
32	Spektrofotometer UV	Analisa pigmen

3.2.3. Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini disajikan dalam Tabel 2, antara lain:

Tabel 2. Bahan Penelitian yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Bahan	Kegunaan
1	Air laut steril	Pembuatan media
2	Air tawar steril	Pembuatan media
3	Alcohol 70%	Sterilisasi
4	Aseton 90 %	Pelarut pigmen
5	Aquades	Pembuatan Media
6	Garam tabor	Penambah salinitas
7	Klorin 60 ppm	Sterilisasi air laut
8	Natrium thiosulfate 30 ppm	Menetralisir kadar klorin
9	NaOH	Pemanenan mikroalga
10	Pupuk Walne	Suplai Nutrien

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pelaksanaan Penelitian

3.3.1.1. Persiapan Alat, Bahan, dan Ruangan

Persiapan dimulai dengan mensterilisasi terlebih dahulu media dan semua peralatan yang akan digunakan pada penelitian. Tujuan sterilisasi adalah agar media beserta alat dan wadah kultur menjadi steril atau bebas dari segala organisme yang tidak diinginkan. Alat – alat dan wadah yang akan digunakan dicuci dengan air bersih dan kemudian disemprot menggunakan alkohol 70%.

3.3.1.2. Sterilisasi Media Kultur

Pembuatan media air laut dilakukan dalam wadah 100 liter yang diisi air laut hingga 100 liter dengan menggunakan penyaring supaya tidak ada kotoran yang akan masuk dan diberi aerasi. Setelah terisi penuh tambahkan klorin sebanyak 17 mL/g dengan menghitung salinitas terlebih dahulu menggunakan refraktometer. Tunggu selama 24 jam. Selanjutnya tambahkan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (*Natrium Thiosulfat*) sebanyak 3 gram yang dilarutkan dengan 50 mL aquades hingga homogen.

Stok air laut steril dengan salinitas 30 ppt kemudian diencerkan dengan salinitas yang diinginkan sesuai perlakuan. Pembuatan media air laut dengan salinitas yang diinginkan dalam kultur skala laboratorium (20 ppt, 30 ppt, 40 ppt) dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus Gunawan (2004) sebagai berikut:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan :

V2 : Volume air yang diinginkan

V1 : Volume air laut (stok)

N2 : Salinitas air yang diinginkan

N1 : Salinitas air laut awal (stok)

15 botol kultur diisi media air laut berbeda salinitas sebanyak 250ml, kemudian setiap botol kultur ditutup dengan kapas, kain kasa dan alumunium foil. Kemudian media air laut di autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 1 atm pada suhu 121⁰C.

3.3.1.3. Pembuatan Media Kultur

Media kultur yang digunakan adalah dengan menyediakan media 15 botol kultur masing – masing berkapasitas 500 ml yang berisi air laut 250 ml yang sudah diukur salinitas menggunakan refraktometer sebesar 20 ppt, 30 ppt, 40 ppt. Setiap perlakuan ada 3 pengulangan. Media air laut sebelumnya telah ditambahkan 1 mL/L pupuk Walne disetiap perlakuan dan diberi aerasi. Formulasi untuk pembuatan larutan stok nutrien, *tracemetal* dan vitamin disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Nutrien

Komposisi	Jumlah (gram)
Pupuk Walne	
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20
H ₃ BO ₃	33,6
NaEDTA	45
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,3
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36
Aquades	1000 mL
Larutan Trace Metal	
ZnCL ₂	2,1
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,9
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,0
HCl	10 mL

3.3.1.5. Perhitungan Kepadatan Sel

Perhitungan kepadatan (jumlah sel/mL) bertujuan untuk mengamati pertumbuhan mikroalga setiap harinya, pertumbuhan *Tchuii* diamati dengan cara mengambil sampel setiap hari menggunakan pipet tetes, kemudian dimasukkan kedalam chamber *haemocytometer*. Selanjutnya dihitung jumlah sel secara langsung menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan alat bantu *handy counter*. Teknik pengenceran dilakukan saat kepadatan *Tchuii* sudah tinggi, rumus perhitungannya diadaptasi metode Isnansetyo dan Kurniastuty (1995) sebagai berikut:

$$\text{Kepadatan} = \frac{N \text{ dalam 4 blok}}{\text{Jumlah blok (4)}} \times 10^4 \left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}} \right)$$

Keterangan :

N : Jumlah sel mikroalga yang teramati

3.3.1.6. Laju Pertumbuhan *Tchuii*

Laju pertumbuhan didapat dari jumlah kepadatan sel selama kultivasi mikroalga. Menurut Hirata *et al.* (1981) rumus laju pertumbuhan mikroalga adalah sebagai berikut :

$$K = 3,22 \frac{\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{t_i - t_0}$$

Keterangan :

K	= laju tumbuh (pembelahan sel/hari)
N _t	= kepadatan sel pada hari t (sel/ml)
N ₀	= kepadatan awal hari (sel/ml)
t _i	= waktu ke-t (hari)
t ₀	= waktu awal (hari)

3.3.1.7. Pemanenan Biomassa *Tchuii*

Pemanenan *Tchuii* dilakukan pada saat fase stasioner yaitu pada masa optimum pertumbuhan mikroalga. Fase stasioner pada kultur mikroalga berkaitan dengan berkurangnya sejumlah besar nutrelin dalam media dan akumulasi senyawa – senyawa beracun sisa metabolisme. Pemanenan dilakukan pada fase stasioner dengan menggunakan modifikasi flokulan yaitu metode pengendapan dengan menggunakan bahan kimia NaOH dengan masing – masing perlakuan diberi sebanyak 1,8 gram. Pengendapan dilakukan selama 24 jam, kemudian dilakukan pemisahan biomassa dan cairan jernihnya. Selanjutnya biomassa dicuci dengan aquades untuk menghilangkan kandungan garamnya, kemudian disaring dengan menggunakan kain satin dan dilakukan pengeringan dengan suhu optimum 40⁰C hingga menjadi kering (Amini, 2010).

3.3.1.8. Analisis Pigmen Klorofil a, b

Menurut Vo (2014) dan Pital (2005) untuk analisis pigmen klorofil a dan b menggunakan volume kultur basah. Kultur basah sampel *Tchuii* sebanyak 20 mL disaring menggunakan kertas *filter milipore*, kemudian dilarutkan pelarut aseton 10 mL, hancurkan dengan vortex hingga homogen. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit, filtrat yang berwarna hijau diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (630, 664, dan 647 nm) dikurangi dengan absorbansi pada panjang gelombang 750 nm. Menurut APHA (2005) hasil serapan diperoleh dimasukkan pada persamaan:

$$\text{Kandungan Klorofil a (mg/L)} = \frac{(11.85 \times A_{664}) - (1.54 \times A_{647}) - (0.08 \times A_{630})}{V_s \times d} \times V_e$$

$$\text{Kandungan Klorofil b (mg/L)} = \frac{(21.03 \times A_{647}) - (5.43 \times A_{664}) - (2.66 \times A_{630})}{V_s \times d} \times V_e$$

Keterangan :
 A_{664} : Nilai absorbansi pada 664 nm
 A_{647} : Nilai absorbansi pada 647 nm
 A_{630} : Nilai absorbansi pada 630 nm
 V_e : Volume ekstrak aseton (ml)
 V_s : Volume contoh air yang disaring (liter)
 d : Lebar diameter cuvet (1cm)

3.3.2. Analisis Data Penelitian

Data hasil penelitian dibuat grafik diolah dengan bantuan program Microsoft Excel dan SPSS 16. Pada program SPSS 16 analisa yang digunakan adalah analisa varian. Analisis varian adalah cara untuk menganalisis variasi respon dan menerapkan porsi varian pada setiap kelompok dari variable independen. Tujuannya adalah untuk menemukan variasi independen dan menentukan bagaimana variabel–variabel tersebut mempengaruhi perlakuan. Sedangkan uji Normalitas dan Homogenitas dilakukan sebagai syarat untuk uji Anova dan uji Tukey HSD adalah untuk mengetahui perbedaan – perbedaan antar variable (Hartono, 2004).