

BAB III

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang telah dijalankan adalah sesuai dengan cara-cara yang disarankan oleh **APHA (1989)**, **RAND & PETROCELLI (1985)** dan **FAO (1977)**. Sedangkan cara pengukuran sifat fiziko-kimia limbah dan tiap unit percobaan dilakukan sesuai dengan cara yang dilakukan oleh **BURING (1979)**, **JUSOP (1981)**, **BUCKMAN & BRADY (1982)**, **HAKIM *et al.* (1986)** dan **DARMAWIJAYA (1997)**.

3.1. Air-uji

Air Sungai Siak yang digunakan sebagai air-uji dalam ujian ketoksikan akut ini. Air ini dipilih karena organisme-uji yang akan digunakan adalah organisme benthos yang hidup di perairan Sungai Siak. Air akan disaring melalui sistem saringan berpasir dan ditapis dengan filter berdiameter 30 μm . Air yang telah disaring diaerasikan selama 24 jam. Kriteria minimum bagi air yang digunakan sebagai bahan pencairan (“diluent”) dalam sesuatu kajian ketoksikan akut adalah air yang dapat menampung kehidupan organisme ujian semasa kajian dijalankan tanpa menimbulkan kemudaratan terhadap organisme tersebut (**RAND, 1980**).

3.2. Organisme-uji

Organisme-uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 spesies makrozoobentos yang akan dipilih dari pengambilan sampel benthos di perairan Sungai Siak. Organisme diambil dengan grab sampler, kemudian dengan “wire-mesh sieve” seperti

yang dilakukan oleh **WILKINSON & BAKER (1994)**. Organisme makro benthos ditempatkan pada tangki stok secara berasingan setiap spesies.

Sebelum ujian ketoksikan dijalankan, organisme benthos diaklimatisasi selama 72 jam (3 hari) dalam tiga akuarium secara berasingan. Air di dalam akuarium diganti setiap 24 jam dan diaerasi. Selama aklimatisasi dijalankan organisme benthos tidak diberi makan, seperti ujian akut yang dilakukan oleh **Syafriadiman (1999)**.

3.3. Penyediaan Larutan Stok Ujian

Larutan ujian yang digunakan adalah limbah komposit dari setiap limbah industri minyak sawit, crumb rubber, pulp & paper, lem plywood dan plywood yang ada di DAS Siak dengan perbandingan kuantitas yang sama, yaitu 1 : 1 : 1 : 1 : 1, dan masing-masing ditimbang dengan tepat dan dilarutkan bagi menghasilkan larutan stok ujian dengan konsentrasi 1000 ml limbah/L. Larutan stok ini diencerkan dengan air Sungai Siak untuk menghasilkan larutan ujian yang kemudian dimasukkan ke dalam tangki stok. Untuk menentukan kuantitas sampel bahan toksis, larutan stok atau air pengenceran yang diperlukan untuk menyediakan konsentrasi larutan ujian yang diinginkan, adalah dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

di mana : N_1 = konsentrasi larutan stok (ml/l)

N_2 = konsentrasi air ujian yang dikehendaki (ml/l)

V_1 = volume larutan stok (l)

V_2 = volume larutan ujian yang dikehendaki (l)

3.4. Persediaan Peralatan

Semua peralatan sebelum digunakan terlebih dahulu direndam dan dicuci dengan asam kromik. Tangki pendedahan sebelumnya direndam dengan asam nitrit 10%(i/i) (REISH & OSHIDA, 1986).

Tangki pendedahan terbuat dari kaca berukuran p x l x t (panjang x lebar x tinggi) adalah 25 cm x 15 cm x 10 cm. Untuk menghindari tangki pecah, maka setiap tangki dimasukkan ke dalam kotak kayu yang disusun sedemikian rupa sehingga tangki tidak jatuh pecah.

3.5. Tangki Kajian

Tiga jenis tangki yang telah digunakan dalam ujian toksisitas ini, yaitu tangki pertama untuk menyimpan larutan stok yang berukuran p x l x t adalah 40 cm x 30 cm x 20 cm, tangki kedua adalah tangki pengumpulan organisme makrozoobentos sebelum ujian dijalankan yang berukuran p x l x t adalah 50 cm x 30 cm x 25 cm dan tangki pendedahan atau tangki untuk ujian organisme, berukuran p x l x t adalah 25 cm x 15 cm x 10 cm.

3.6. Sistem Pendedahan

Sistem pendedahan yang telah digunakan adalah sistem statik. Sistem statik biasanya dijalankan selama 96 jam dan larutannya tidak ditukar selama pendedahan. Oleh karena bahan efluen limbah yang digunakan tidak mudah menguap atau terikat/bereaksi dengan permukaan tangki, maka sistem pendedahan uji toksisitas dengan sistem statik adalah cocok dan sesuai digunakan dalam penelitian seperti ini. Sistem pendedahan dalam penelitian ini dilakukan seperti yang dilakukan oleh RAND & PETROCELLI (1985), REISH & OSHIDA (1986). Kelebihan sistem statik adalah lebih murah jika dibandingkan dengan

sistem semi-statik, aliran terus dan *in situ*. Juga dapat menggambarkan tahap pencemaran di kawasan-kawasan teluk, perairan tertutup dan dapat memberikan peringatan mengenai masalah-masalah berat yang mungkin terjadi di suatu lingkungan perairan. Selama penelitian telah dijalankan seperti yang disarankan oleh **WARD & PARRISH (1982)** bahwa organisme-organisme uji supaya didedahkan secepat mungkin setiap setelah larutan uji siap disediakan.

3.7. Ujian Definitif

Sebelum memulakan kajian toksisitas limbah industri yang sebenarnya, maka didalam penelitian ini telah dilakukan ujian pendahuluan untuk menentukan/mencari tingkat konsentrasi limbah yang akan digunakan. Kepentingan ujian definitif ini adalah untuk menentukan berapa konsentrasi limbah yang akan digunakan untuk ujian sesungguhnya. Empat konsentrasi dari limbah komposit setiap limbah industri minyak sawit, crumb rubber, pulp & paper, lem plywood dan plywood yang akan digunakan selama uji-coba toksisitas ini dan satu kontrol yang akan digunakan dalam ujian untuk menentukan tingkat konsentrasi kematian 0% dan 100% terhadap organisme makrozoobenthos.

Setelah tingkat konsentrasi limbah yang dapat membunuh semua atau tidak ada organisme makrozoobenthos yang mati, maka pemilihan konsentrasi-konsentrasi limbah yang akan diuji dalam ujian sebenarnya adalah 0% dan 100% yang dapat mematikan organisme makrozoobentos. Ujian sebenarnya telah menggunakan satu kontrol dan lima nilai konsentrasi seperti dalam Tabel 3.1. Jika kontrol mencatat kematian lebih dari 10% maka ujian tersebut terpaksa diulang, karena penelitian akan menentukan kematian organisme makrozoobentos bukan disebabkan oleh bahan selain dari bahan ujian.

3.8. Pengamatan

Pengamatan terhadap organisme makrozoobentos ujian dilakukan setiap 12 jam selama 96 jam. Jumlah kematian dan perubahan-perubahan yang dilihat akan dicatatkan. Organisme makrozoobentos ujian yang mati dikeluarkan secepat mungkin dari tangki, dagingnya diambil dan dimasukkan ke dalam botol polietilena serta dimasukkan ke dalam “refrigerator” sebelum penentuan bahan-bahan kimia toksis. Pengukuran parameter kualitas air dalam tangki pendedahan dilakukan minimal sekali dalam 48 jam. Sampel air diambil sebelum dan sesudah berakhir ujian dijalankan.

3.9. Penentuan Nilai LC_{50} dan Paras Selamat Biologi (Biological Safety Levels)

Nilai kepekatan maut yang dianggarkan, yaitu LC_{50} 96 jam adalah kepekatan bahan toksik yang mematikan 50% populasi organisme yang diuji selepas 96 jam pendedahan. Metode penganggaran nilai LC_{50} dibuat dengan metode yang dibuat oleh EPA (1993) dan STEPHAN (1977). Namun demikian, dalam penelitian ini nilai LC_{50} 96 jam ditentukan dengan empat cara, yaitu dengan kaedah aritmetik, grafik logaritma, grafik probit dan grafik Spearman-Kärber, seperti yang disarankan oleh RAND & PETROCELLI (1985), dan REISH & OSHIDA (1986) serta yang digunakan oleh SYAFRIADIMAN (1999).

Cara grafik probit untuk menentukan nilai LC_{50} dengan penentuan grafik yang jitu yaitu dengan menukarkan nilai persentase kematian terhadap nilai setara normal (Normal Equivalent Deviations, NEDs). Kaedah grafik probit adalah kaedah yang menggunakan pendekatan statistik untuk melukis garis terbaik melalui data-data toksisitas. Nilai-nilai probit diplotkan dengan nilai logaritma kepekatan dan garisan lurus terbaik dilukis melalui setiap titik tersebut (RAND & PETROCELLI, 1985). Metode grafik Spearman-Kärber adalah kaedah model

penentuan bebas yang memerlukan taburan toleransi bersimetri dengan mengabaikan nilai persentase yang ekstrim (**RAND & PETROCELLI 1985**). Kaedah grafik aritmatik adalah pembuatan grafik yang dilakukan dengan memplotkan nilai-nilai persentase kemandirian dengan kepekatan limbah komposit ujian. Kaedah grafik logaritma adalah hampir sama dengan kaedah aritmatik, di mana kaedah grafik logaritma dilakukan dengan memplotkan nilai-nilai persentase kemandirian dengan logaritma kepekatan limbah ujian.

Paras selamat biologi (Biological Safety Levels) (BSL) di dalam kajian ini dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$BSL = LC_{50} \text{ 96 jam} \times \text{"application factor"}, \text{ di mana : BSL} = \text{Paras Selamat Biologi}$$

Bilangan "application factor" yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah mengikut **DENTON & BULDON-JONES (1982)**, **EPA (1993)**, **AWALUDDIN *et al.* (1996)**, **TRAIN (1979)** dan **MARZUKI (1994)**.

3.10. Analisis Data

Data-data yang diperoleh akan ditabulasikan dalam bentuk tabel dan grafik serta dibahas secara analisis statistik toksikologi (**RAND & PETROCELLI, 1985**). Perlakuan yang memberikan perbezaan yang berarti akan dianalisis lanjut dengan berbagai uji seperti uji Newman-Keuls untuk kevalidan hasil akan diuji pada tingkat nyata 99%. Khusus untuk data kualitas limbah buangan setiap industri sebelum maupun sesudah digunakan akan dibandingkan dengan PP. No. 20 Tahun 1990 tentang Pencemaran Air dan Kepmen Kependudukan dan Lingkungan Hidup No. 03/MENKLH/II/1991 tentang baku mutu limbah cair untuk industri.

Analisis varians untuk data LC50 96 jam bagi setiap metoda aritmatik, logaritma dan logprobit akan dilakukan. Analisis varians ditentukan dengan menggunakan program software microstat yaitu untuk menentukan kesan faktor utama saja. Perbedaan berarti ($p < 0.01$ atau $p < 0.05$) yang terperinci akan dilakukan melalui kaedah Newman-Keuls.