

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi *Metallothionein* pada jaringan insang, lambung, dan otot kerang hijau (*Perna viridis* L.) yang terpapar Hg, Pb dan Cd melalui analisis *Western Blot*. Penelitian ini dilakukan sebagai bentuk respon atau biomarker terhadap kondisi pada kawasan Pantai Utara yaitu Kenjeran (Surabaya), Ngemboh dan Banyu Urip (Gresik), serta sampel air dari perairan di ketiga lokasi yang meliputi parameter kualitas air pendukung yaitu suhu, salinitas, pH (*potential Hydrogen*), oksigen terlarut/DO (Dissolved Oxygen), dan total bahan organik/TOM (*Total Organic Matter*).

3.2 Alat dan Bahan

Beberapa alat dan bahan yang digunakan untuk menunjang keberhasilan dalam penelitian sangat penting digunakan. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif yang bermaksud untuk membuat gambaran mengenai situasi atau kejadian. Pada metode ini pengambilan data dilakukan tidak hanya terbatas pada pengumpulan dan penyusunan data, tapi juga meliputi analisis dan pembahasan dari data tersebut. Metode ini bertujuan untuk membuat penggambaran secara sistematis, nyata dan akurat mengenai fakta-fakta dan sifat-sifat populasi atau daerah tertentu (Suryabrata, 1994). Pengambilan data penelitian ini akan dilakukan dengan mengambil dua macam data yaitu data primer dan data sekunder.

3.3.1 Data Primer

Data primer adalah data yang dikumpulkan langsung dari sumber asli (pertama) oleh peneliti di lapangan tanpa perantara (Mulyanto, 2008). Data primer dalam hal ini didapat dari hasil observasi dan wawancara.

a. Observasi

Menurut Akurinto (1996) dalam Adirama (2013), observasi merupakan pengamatan meliputi kegiatan pemantauan terhadap suatu objek menggunakan seluruh alat indra. Observasi dilakukan melalui alat indra penglihatan, penciuman, pendengaran, dan perasaan. Observasi yang dilakukan meliputi kegiatan pengambilan sampel organ dalam insang, lambung dan otot kerang hijau (*Perna viridis* L.) serta pengukuran parameter fisika dan kimia kualitas air dan mengadakan pengamatan secara langsung tentang kondisi ekosistem pantai tempat pengambilan sampel.

b. Wawancara

Wawancara merupakan pertemuan dua orang untuk bertukar informasi dan ide melalui tanya jawab, sehingga dapat dikonstruksikan makna dalam suatu topik tertentu (Sugiyono, 2010). Wawancara dalam penelitian ini bertujuan mencari informasi secara lisan dengan menggunakan narasumber (penduduk sekitar).

3.3.2 Data Sekunder

Mulyanto (2008), menjelaskan bahwa data sekunder merupakan data primer yang telah diolah pihak lain yang kemudian disajikan oleh pihak lain atau pihak pengumpul dalam bentuk media massa, hasil penelitian peneliti lain (jurnal penelitian, laporan skripsi atau PKL), penelitian kepustakaan, pusat bank data, lembaga penelitian, BPS, maupun lembaga pemerintah atau swasta.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penentuan Stasiun Penelitian

Pengambilan sampel kerang hijau (*Perna viridis* L.), air, dan sedimen dilakukan pada 3 lokasi (stasiun) pengamatan yaitu di pantai Kenjeran (Surabaya), Banyu Urip dan Ngemboh (Gresik). Penetapan lokasi (stasiun) pengamatan berdasarkan adanya aktivitas manusia untuk mengetahui hubungan kadar metallothionein pada insang, lambung dan otot kerang hijau (*Perna viridis* L.) yang diduga tercemar logam berat Hg, Pb dan Cd, dan selanjutnya dapat dibandingkan antara ketiga lokasi pengamatan tersebut. Stasiun 1 merupakan daerah kawasan industri yaitu perairan Kenjeran, stasiun 2 yaitu perairan Banyu Urip adalah daerah yang merupakan tempat sandaran kapal milik nelayan setempat serta dekat dengan pemukiman penduduk, dan stasiun 3 yaitu perairan Ngemboh yang berada di daerah dekat dengan perusahaan pembuatan kapal. Selanjutnya dari 3 lokasi tersebut ditentukan titik pengambilan sampel.

Perbedaan tempat hidup ini diduga mempengaruhi masuknya logam berat ke dalam tubuh kerang hijau (*Perna viridis* L.). Setiap lokasi pengambilan sampel terpilih memiliki aktivitas manusia yang berbeda. Dari perbedaan ini diharapkan akan didapatkan informasi yang lebih beragam mengenai ekspresi metallothionein yang tercemar logam Hg, Pb dan Cd dan Hg dalam tubuh kerang hijau (*Perna viridis* L.).

3.4.2 Teknik Pengambilan Sampel Kerang Hijau (*Perna viridis* L.), Air dan Sedimen

Sampel kerang hijau (*Perna viridis* L.) pada penelitian ini diambil dari bagan yang ada di laut dengan hati-hati untuk menghindari kerusakan organ dalam yang akan diteliti. Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada masing-masing lokasi. Masing-masing lokasi akan dipilih satu individu yang akan dianalisis ekspresi metallothionein dengan ketentuan kerang hijau yang sudah

dewasa dan mempunyai umur yang sama dapat dilihat pada berat serta panjang yang sama agar seragam. Sampel kerang hijau diukur panjang dan lebar cangkangnya menggunakan jangka sorong. Kerang hijau yang akan diamati organ nya dibedah secepat mungkin untuk menghindari kerusakan. Sampel organ sebelum dianalisis metallothionein nya harus dalam keadaan segar (baru diambil dari tubuh kerang hijau). Sebagian organ dipisahkan untuk dianalisis kandungan logam berat Hg, Pb dan Cd nya. Sampel sedimen diambil dari lumpur berpasir tempat hidup kerang hijau hidup yang kemudian akan dianalisis logam berat yang terkandung di dalamnya.

Menurut Rajeshkumar (2013), setelah biota dibedah dan didapatkan organnya lalu dicuci dengan air suling, ditimbang dan dikemas dalam kantong plastik atau toples dan disimpan pada suhu 20°C sebelum dianalisis. Sampel air sebagai parameter pendukung diambil pada 3 lokasi dan ditempatkan pada botol 600 ml, air yang diambil adalah air di permukaan. Air sampel yang didapat diberi pengawet HNO₃ pekat sebanyak 1 ml. Parameter kualitas air yang diambil yaitu suhu, salinitas, pH, oksigen terlarut dan TOM.

3.5 Tahap Pengujian Sampel

3.5.1 Pengujian Kadar Metallothionein pada Insang, Lambung dan Otot Kerang Hijau (*Perna viridis* L.)

3.5.1.1 Isolasi Protein

Tahap awal dalam melakukan isolasi protein yaitu preparasi sampel protein. Menurut Fatchiyah, *et al.* (2001), metode dalam preparasi sampel protein insang, lambung dan otot adalah sebagai berikut:

1. Mengambil organ insang, lambung dan otot masing-masing sebanyak 0,5 g kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali untuk membersihkan darah yang masih tersisa

2. Menggerus organ sampai halus (tetapi jangan sampai terlalu lama) di dalam mortar yang sudah didinginkan yang diletakkan dalam bak es
3. Menambahkan buffer ekstrak sebanyak 1 mL ke dalam mortar kemudian ratakan
4. Menuang homogenat ke dalam tabung Eppendorf atau tabung sentrifuga kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4⁰C selama 10 menit
5. Membuang pelet yang mengendap pada dasar tabung
6. Memisahkan supernatan ke dalam 2 tabung. Gunakan 20 µL untuk sampel elektroforesis dan sisanya untuk diukur kadar proteinnya dengan metode Bradford
7. Menyimpan sampel pada suhu 4⁰C bila tidak segera dipakai

3.5.1.2 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE

Fatchiyah, *et al.* (2011), menyatakan prosedur elektroforesis protein dengan SDS-Page adalah sebagai berikut

A. Menyiapkan sampel

1. Menambahkan sampel bufer ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1) dalam tabung Eppendorf
2. Memanaskan sampel pada suhu 100⁰C selama 5 menit
3. Setelah dingin, Menyimpan pada suhu 20⁰C bila sampel tidak langsung dipakai

B. Pembuatan Media/Gel Elektroforesis SDS-PAGE

Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media/gel untuk elektroforesis SDS adalah sebagai berikut:

1. Menyusun plate pembentuk gel
2. Membuat separating gel 12,5%. Dengan cara:
 - a. Menyiapkan tabung polipropilen 50ml

- b. Memasukkan 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung
- c. Memasukkan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan
- d. Memasukkan aquabides 1,505 ml. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan
- e. Memasukkan 75 μ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
- f. Memasukkan 75 μ l APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
- g. Memasukkan 6,25 μ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
- h. Menuang larutan kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (jaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate dengan segera
- i. Menambahkan aquades secara perlahan di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang
- j. Membiarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk). Kemudian air yang menutup separating gel dibuang
- k. Sesudah separating gel memadat, selanjutnya menyiapkan stacking gel 3%. Dengan cara:
 - Menyiapkan tabung polipropilen 50ml
 - Memasukkan 0,45 ml stok akrilamida dalam tabung
 - Masukkan 0,38 ml 1M Tris pH 6,8. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
 - Masukkan aquabides 2,11 ml. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
 - Memasukkan 30 μ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
 - Memasukkan 5 μ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan

C. Running Elektroforesis Sodium Dodesil Poliakrilamid (SDS-PAGE)

Tahapan proses SDS-PAGE ini, diantaranya:

1. Memasukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis
2. Menuang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam
3. Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel atau diantara sumur sampel, maka gelembung tersebut harus dihilangkan
4. Memasukkan sampel sebanyak 10-20 μ l (yang kandungan proteinnya minimal 0,1 g dan maksimal 20-40 g) secara hati-hati ke dalam dasar sumur gel menggunakan Syringe Hamilton
5. Membilas syringe sampai 3x dengan air atau dengan running buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

D. Running Sampel

1. Tahap awal untuk memulai running, menghubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
2. Melakukan running pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai tracking dye mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel
3. Setelah selesai, running buffer dituang dan ambil gel dari plate

E. Pewarnaan (Staining) Media/Gel Hasil Elektroforesis Sodium Dodesil Poliakrilamid (SDS-PAGE)

1. Pewarnaan Commasie Brilliant Blue

- a. Tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk.

Tabel 1. Komposisi larutan Staining dan Destaining

Larutan staining 1 liter		Larutan destaining 1 liter	
Coomassie Blue R-250	1,0 g	Metanol	100 ml
Metanol	450 ml	Asam asetat glasial	100 ml
Aquades	450 ml		
Asam asetat glasila	100 ml		

- b. Merendam gel dalam 20 ml staining solution sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, menuang kembali larutan staining pada wadahnya
- c. Mencuci dengan air beberapa kali. Kemudian, merendam gel dalam larutan 50 ml destaining solution sambil digoyang selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita protein terlihat jelas.

3.5.1.3 Pengujian Spesifitas Reaksi Antigen Antibodi dengan *Western Blotting*

Western blot adalah metode untuk mengidentifikasi antibodi spesifik pada suatu protein dengan berat molekul tertentu yang telah diseparasi. Pada awalnya berat molekul protein diseparasi atau dipisahkan dengan menggunakan SDS PAGE elektroforesis kemudian ditransfer ke kertas nitrocellulose (NC) untuk melakukan *Western blot*. Fatchiyah, *et al.* (2011), menyatakan prosedur Elektroforesis protein dengan SDS-Page adalah sebagai berikut:

A. Preparasi Awal

1. Setiap sampel dirunning bersamaan. Sumur nomor 1 diisi dengan standart berat molekul protein atau marker. Sampel protein dari insang, lambung dan otot kerang hijau dari Kenjeran dimasukkan pada sumur nomor 2 sampai 4. Sumur nomor 5 sampai 7 diisi dengan sampel protein dari insang, lambung

dan otot kerang hjaiu dari Banyu Urip. Sumur nomor 8 sampai 10 diisi dengan sampel protein dari insang, lambung dan otot kerang hjaiu dari Ngemboh

2. Antibodi yang digunakan:

- Antibodi primer : Rabbit anti-MT poliklonal pengenceran 1: 500
- Antibodi sekunder: Goat Anti-Rabbit IgG – AP; Sc-2057
- Substrat : Western blue substrat solution (Stress Marq, Bioscience Inc)
- Akrilamid : 12,5 %
- Marker : Spectra™ Multicolor, Broad Range Protein Ladder, 20 µl

B. Prosedur Kerja

1. Merendam gel hasil elektroforesis dan kertas saring Whatman dalam PBST (PBS yang mengandung 0,05% Tween-20)
2. Merendam membran PVDF dalam metanol, kemudian merendam dalam bufer transfer
3. Menyusun ketiga komponen tersebut mulai dari bawah ke atas secara berturut-turut mulai kertas saring, membran PVDF, gel dan kertas saring pada wet transblot (Biocraft)
4. Mengisikan bufer blotting pada chamber, kemudian mentransfer pada 20 V selama 15 jam
5. Untuk mengetahui apakah protein pada gel sudah tertransfer pada membran PVDF, maka protein diwarnai dengan Ponceau selama 5 menit kemudian dibilas dengan aquades. Protein dikatakan sudah tertransfer bila terdapat gambaran pola pita protein pada membran sesudah membran dibilas
6. Merendam membran PVDF dalam bloto PBST) selama 60 menit sambil diagitasi, kemudian cuci dalam PBST

7. Menginkubasi membran yang berisi sampel protein dalam antibodi primer yaitu Rabbit anti-MT monoklonal dengan pengenceran 1: 25,000 selama semalam dalam lemari pendingin, kemudian dicuci dalam TBS
8. Merendam membran dalam antobodi sekunder (Anti-Rabbit IgG (HtL) Biotin Conjugate dengan pengenceran 1 : 1000) selama 60 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dalam PBST
9. Merendam membran dengan 1 mL larutan substrat Western Blue sampai pita protein berwarna biru tua terlihat. Ini menandakan adanya protein target dalam sampel yang terikat dengan antibodi primer
10. Mencuci membran dengan aquades
11. Sampel dikatakan mengekspresikan MT jika terdapat pita protein

3.5.2 Pengujian Kadar Logam Berat Hg, Pb dan Cd pada Air, Sedimen serta Insang, Lambung dan Otot Kerang Hijau (*Perna viridis* L.)

Penentuan logam berat Hg, Pb dan Cd pada perairan diukur menggunakan metode *Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (AAS) yaitu :

1. Menimbang masing-masing sampel padat $\pm 0,5$ gram dengan timbangan Sartorius untuk mendapatkan berat basah
2. Mengoven sampai padat pada suhu ± 105 OC selama 1 jam sampai mendapat berat konstan
3. Menimbang berat konstan dengan timbangan Sartorius sebagai berat kering
4. Memasukkan sampel yang sudah kering ke dalam beaker glass 100 ml
5. Menambahkan HNO₃ dengan perbandingan 1 : 1 (HNO₃ : HCL) sebanyak $\pm 10 - 15$ ml
6. Memanaskan di atas hot plate di dalam kamar asam sampai ± 3 ml
7. Menyaring dengan kertas saring ke dalam labu ukur 50 ml
8. Mengulang proses penyaringan sampai tanda batas labu ukur dengan terlebih dahulu menambahkan 15 ml aquades ke dalam beaker glass tempat sampel

9. Menganalisis menggunakan mesin *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) sampai dengan panjang gelombang 263,3 nm

10. Menyiapkan larutan standar

Dianalisis larutan standar dengan mesin AAS dan mencatat nilai standarnya kemudian membuat kurva kalibrasinya. Larutan standar ini berfungsi untuk membantu nilai konsentrasi logam Hg, Pb dan Cd pada sampel, karena prinsip kerja mesin AAS hanya menentukan nilai absorbansi dengan sampel.

3.5.3 Metode Analisis Kualitas Air

3.5.3.1 Parameter Fisika

a. Suhu

Menurut SNI (1990), prosedur pengukuran suhu menggunakan thermometer Hg adalah sebagai berikut:

- Memasukkan thermometer Hg ke dalam peraran dengan membelakangi cahaya matahari
- Menunggu beberapa saat sampai air raksa dalam thermometer berhenti pada skala tertentu
- Membaca skala pada saat thermometer masih dalam air
- Mencatat dalam skala $^{\circ}\text{C}$

3.5.3.2 Parameter Kimia

a. Salinitas

Menurut Hariyadi *et al.* (1992), prosedur pengukuran salinitas menggunakan refraktometer adalah sebagai berikut:

- Membran refraktometer dibersihkan dan dikalibrasi menggunakan aquades dan dikeringkan dengan tisu secara searah
- Air laut diambil menggunakan pipe tetes dan diteteskan 1-2 tetes pada membran refraktometer lalu ditutup dengan penutup membran

- Refraktometer diarahkan menuju sumber cahaya dan diamati nilai salinitas langsung dibaca pada lensa refraktometer, yaitu skala pada batas antara bagian yang berwarna kebiruan di sebelah kanan tiang skala yang bersatuan ppt (skala sebelah kiri menunjukkan nilai berat jenis air)

b. pH (*Potensial Hydrogen*)

Menurut Hariyadi *et al.* (1992), prosedur analisis derajat keasaman (pH) pada perairan adalah sebagai berikut:

- Memasukkan pH paper ke dalam air sekitar 5 menit.
- Mengangkat pH paper ke atas dan dikibas-kibaskan hingga setengah kering.
- Mencocokkan perubahan warna pH paper pada kotak standar

c. Kadar Oksigen Terlarut (*Dissolved Oxygen*)

Prosedur pengukuran oksigen terlarut dilakukan dengan cara Winkler menurut Ly dan Lai (1997), adalah sebagai berikut:

- Mengaktifkan DO meter dengan menekan tombol ON
- Melakukan standarisasi terlebih dahulu pada bagian ujung probe menggunakan aquades
- Ujung DO meter dimasukkan dalam perairan
- Menunggu sampai nilai DO yang ditunjukkan tidak berubah-ubah dan dicatat nilai DO tersebut.

d. Kadar Total Bahan Organik (*Total Organic Matter*)

Menurut Hariyadi *et al.* (1992), prosedur pengukuran TOM adalah sebagai berikut:

- Air sampel diambil sebanyak 50 ml lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- KMnO_4 ditambahkan sebanyak 9,5 ml
- H_2SO_4 (1:4) ditambahkan sebanyak 10 ml dan dihomogenkan
- Sampel dipanaskan menggunakan hot plate sampai suhu 70-80 °C lalu diangkat dan ditunggu hingga suhu turun menjadi 60-70 °C

- Na-oxalat 0,01 N ditambahkan perlahan sampai tidak berwarna pertama kali
- Sampel dititrasi dengan KMnO_4 0,01 N sampai terbentuk warna merah muda pertama kali dan dicatat sebagai ml titran (x ml)
- Dilakukan prosedur di atas untuk sampel aquades dan dicatat titran yang digunakan (y ml)
- Kadar TOM dihitung dengan rumus:

$$\text{TOM (mg/L)} = \frac{(x - y) \times 31,6 \times 0,01 \times 1000}{\text{mL air sampel}}$$

Keterangan:

- x : ml titran untuk air sampel
- y : ml titran untuk aquades
- 31,6 : 1/5 dari BM KMnO_4 (1 mol KMnO_4 melepas 5 oksigen dalam reaksi ini)
- 0,01 : Molaritas KMnO_4
- 1000 : konversi dari ml ke liter