

### **3. MATERI DAN METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Materi Penelitian**

Materi yang ada dalam penelitian ini adalah kandungan logam berat timbal (Pb) pada Tiram (*Saccostrea glomerata*), dengan membandingkan di tiga perairan, yaitu Pantai Karanggongso, PPN Prigi dan Pantai Damas Trenggalek Jawa Timur. Selain itu juga dilakukan pengukuran logam berat Pb pada air dan sedimen. Adapun parameter kualitas air disekitar tiram yang mendukung penelitian ini adalah parameter fisika seperti suhu dan untuk parameter kimia seperti salinitas, oksigen terlarut (DO) dan derajat keasaman (pH).

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif yang menggambarkan keadaan lokasi penelitian secara nyata yang sesuai dengan kondisi lapang. Metode penelitian deskriptif adalah salah satu metode penelitian yang banyak digunakan pada penelitian yang bertujuan untuk menjelaskan suatu kejadian. Seperti yang dikemukakan oleh Sugiyono (2011) penelitian deskriptif adalah sebuah penelitian yang bertujuan untuk memberikan atau menjabarkan suatu keadaan atau fenomena yang terjadi saat ini dengan menggunakan prosedur ilmiah untuk menjawab masalah secara aktual. Di dalam penelitian ini dilakukan di tiga daerah yaitu Pantai Karanggongso, PPN Prigi dan Pantai Damas Trenggalek Jawa Timur. Nazir (2009), menyatakan bahwa metode

deskriptif adalah suatu metode dalam meneliti suatu objek pada masa sekarang dengan membuat gambaran secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang sedang diselidiki.

### **3.4 Penentuan Stasiun**

Penentuan lokasi penelitian berdasarkan banyaknya sebaran tiram (*Saccostrea glomerata*) di beberapa bagian dengan metode purposive sampling. Selain itu penentuan lokasi juga berdasarkan adanya aktifitas manusia dan industri yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup tiram (*Saccostrea glomerata*). Sampel diambil dari 3 lokasi yang memiliki aktifitas atau kegiatan perikanan yang diduga mendapatkan masukan bahan pencemar. Lokasi 1 yaitu pada Pantai Karanggongso yang terletak di Desa Tasikmadu Kecamatan Watulimo Kabupaten Trenggalek. Pantai Karanggongso biasa dikenal sebagai pantai pasir putih adalah salah satu objek wisata alam yang banyak dikunjungi pengunjung. Pada Lokasi kedua yaitu PPN Prigi merupakan salah satu objek wisata yang sering dikunjungi karena merupakan pelabuhan nasional dimana tempat penangkapan ikan terbesar di pantai Selatan pulau Jawa. Lokasi ketiga yaitu pada pantai Damas yang terletak pada Desa Karanggandu kecamatan Watulimo, Kabupaten Trenggalek. Pada pantai Damas ini merupakan pantai yang masih belum banyak dikunjungi oleh para wisatawan dan masih alami. Pada pantai ini dapat dijadikan sebagai kontrol karena dari ketiga pantai tersebut diduga pantai Damas merupakan pantai yang paling sedikit mendapat masukan limbah. Dengan adanya perbedaan pada lokasi ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait kandungan logam berat timbal (Pb) di Tiram (*Saccostrea glomerata*), sedimen dan air di ketiga lokasi tersebut.

Sampel yang diambil pada penelitian ini adalah sampel air, sedimen dan tiram (*Saccostrea glomerata*). Pengambilan sampel berdasarkan survei lapang

yang telah dilakukan pada pertengahan bulan Januari – Maret 2017. Pengambilan sampel dilakukan 3 kali pengulangan. Jumlah tiram dari masing-masing lokasi pengamatan adalah sebanyak 9 ekor dan jumlah keseluruhannya adalah 27 ekor (sampel). Denah pengambilan sampel pada masing masing stasiun penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3**.



**Gambar 3.** Tiga lokasi stasiun pengambilan sampel pada penelitian. A) Lokasi penelitian di PPN Prigi dengan tiga (merah) stasiun. B) Lokasi penelitian di pantai Karanggongso dengan tiga (biru) stasiun. C) Lokasi penelitian di pantai Damas dengan tiga (kuning) stasiun.

### 3.5 Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan 1 kali dengan menggunakan metode Purposive sampling. Menurut Notoatmodjo (2010) Purposive sampling adalah pengambilan sampel yang berdasarkan atas suatu pertimbangan tertentu seperti sifat-sifat populasi ataupun ciri-ciri yang sudah diketahui sebelumnya. Tujuan dari pengambilan sampel tidak secara random dimaksudkan agar mempermudah pengamatan sampel selanjutnya. Penelitian ini dilakukan di 3 stasiun yaitu Pantai Karanggongso, PPN Prigi dan Pantai Damas

Trenggalek Jawa Timur. Pada masing-masing stasiun diambil 3 titik pengambilan sampel. Sampel yang diambil pada setiap titik pengambilan sampel adalah tiram (*Saccostrea glomerata*), air dan sedimen di sekitar tiram (*Saccostrea glomerata*).

### **3.5.1 Pengambilan Sampel**

Dalam penelitian ini diperlukan pengambilan air, sedimen dan tiram pada masing-masing lokasi sebagai sampel yang akan dianalisis logam beratnya di laboratorium. Pengamatan di laboratorium dilakukan pada bulan Januari 2017. Pada masing-masing lokasi pengamatan dilakukan ulangan 3 kali dengan total tiram yang dipakai sebanyak 27 ekor.

#### **a. Pengambilan Sampel Tiram (*Saccostrea glomerata*)**

Pengambilan sampel tiram (*Saccostrea glomerata*) dilakukan dengan mengidentifikasi terlebih dahulu morfologi dan anatomi dari tiram tersebut. Setelah itu diambil tiram dengan metode *composit sampling* yang bertujuan untuk mendapatkan perwakilan sampel pada tiap pengulangan yang diambil. Sampel tiram yang teridentifikasi dan didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik. Langkah selanjutnya yaitu memberi label pada tiap plastik yang berisi tiram (*Saccostrea glomerata*). Isi dari label tersebut meliputi stasiun, pengulangan dan jam pengambilan sampel. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam *coolbox* yang telah diisi es batu. Sebelum sampel tiram (*Saccostrea glomerata*) diujikan di laboratorium cangkang, dan daging dipisahkan. Daging tiram (*Saccostrea glomerata*) yang sudah di dalam botol film kemudian dimasukkan ke kulkas sebelum di ujikan di laboratorium.

#### **b. Pengambilan Sampel Sedimen**

Pengambilan sampel sedimen diambil secara langsung dengan penyelaman oleh nelayan ke dasar perairan tempat tiram (*Saccostrea glomerata*) hidup, selanjutnya sedimen diambil dengan menggunakan sekop dan dimasukkan ke dalam kantong plastik klip yang berukuran 15x12 cm. Pada masing-masing perairan cukup 1 kantong untuk sedimen jadi total sampel sedimen yang diamati yaitu 3 kantong plastik. Sampel sedimen yang diambil merupakan sedimen pada bagian permukaan dasar perairan. Sampel sedimen selanjutnya diberi kertas label dan dimasukkan kedalam *coolbox*. Setelah sampai di laboratorium sampel sedimen dijemur terlebih dahulu agar kadar air dalam sedimen berkurang dan didapat kadang kering. Selanjutnya diukur kandungan logam berat timbal (Pb) dengan menggunakan metode AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*) dengan Panjang gelombang 228, 8 nm.

#### **c. Pengambilan Sampel Air**

Pengambilan sampel air diambil secara langsung dan ditempatkan pada botol air mineral 600 ml, air yang di ambil adalah air pada permukaan, kemudian air sampel di masukkan ke dalam botol lalu ditambahkan dengan HNO<sub>3</sub> pekat sebanyak 10 tetes dan diberi kertas label untuk pengukuran logam berat Pb. Selanjutnya sampel air dimasukkan ke dalam *coolbox* untuk kemudian di Laboratorium dan dimasukkan ke dalam kulkas. Selanjutnya sampel air dianalisa di Laboratorium untuk memperoleh hasil kandungan logam berat Pb menggunakan metode AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*) dengan Panjang gelombang 228, 8 nm.

Air sampel dimasukkan ke dalam botol mineral 600 ml dan ditandai sesuai lokasi pengambilan sampel dan langsung dimasukkan ke dalam *coolbox*. Setelah sampai di Laboratorium selanjutnya sampel dimasukkan kedalam kulkas

dan selanjutnya dianalisis untuk mendapatkan hasil. Sampel air yang diambil sesuai dengan tempat yang terdapat tiram (*Saccostrea glomerata*) dan sesuai lokasi sampling.

### **3.6 Pengukuran Kadar Metallothionien dengan Metode ELISA**

Linde dan Vazquez (2006), menyebutkan bahwa untuk menentukan kadar MT secara kuantitatif ada beberapa tahapan, yaitu sebagai berikut:

- 1) Tahapan Pengambilan Sampel.
  - Sampel organ tiram diambil sebanyak 0,5 gram dan dicuci dengan menggunakan PBSS sebanyak 3 kali.
  - Memasukan sampel kedalam kantong plastik dengan diberi es batu ( maksimum 4 jam untuk proses homogenasi ).
  - Sampel segera dibekukan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  bila selang waktu akan dihomogenasi lebih dari 4 jam.
- 2) Tahap Homogenasi.
  - Menggerus jaringan dalam mortal yang sudah didinginkan dan menambahkan 3 ml larutan buffer (0,5 M sukrosa, 20nM Tria-Hcl buffer, pH 8,6, mengandung 0,01%  $\beta$ -mercaptoethanol) dalam plastik atau tabung kaca.
  - Menghomogenkan jaringan dengan menggunakan homogenizer jaringan
  - Menambahkan Aliquot (larutan induk) sebanyak 3 ml kedalam larutan homogen.
  - Sebagai kontrol, jumlah yang di ketahui dari standar Metallothionein untuk mengkalibrasi hasil yang diperoleh, dapat disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - Percobaan dapat berhenti pada tahapan ini
- 3) Tahapan Ekstraksi

- Mensentrifugasi larutan homogen di 30.000 x g selama 20 menit guna mendapatkan supernatan yang mengandung metallothionien.
  - Menambahkan 1,05 ml etanol absolut dingin (20°C) dan 80 µl chloroform per 1 ml supernatan yang dihasilkan.
  - Mensentrifugasi sampai dingin (0 – 4°C) pada kecepatan 6000 x g selama 10 menit
  - Menambahkan 3 ml etanol dingin pada supernatan yang dihasilkan dan menyimpan pada suhu -20°C selama 1 jam.
  - Langkah analisi dapat berenti pada tahapan ini
- 4) Tahap Pemurnian Metallothionein dan kuantifikasi
- Mensentrifugasi supernatan pada 6000 x g selama 10 menit
  - Mencuci pellet yang dihasilkan dengan etanol : chloroform : homogenisasi penyangga (87: 1 : 12 ).
  - Mensentrifugasi lagi pada 6000 x g selama 10 menit.
  - Mengeringkan dibawah aliran gas nitrogen untuk menyelesaikan penguapan.
  - Menggerus pelet kering dalam 300 ml dari 5 mM tris-HCL , 1 mM EDTA, pH 7.
  - Mensuspensikan fraksi metallothionein menjadi 4,2 ml 0,43 mM 5,5 ditrobis (asam nitrobenzoic) dalam buffer fosfat 0,2 M , ph 8.
  - Mendinginkan selama 30 menit pada suhu kamar untuk mengurangi konsentrasi sulfidri.
- 5) Tahapan Estimasi dengan metode ELISA ( suwarno *et al.*,2010)
- Pembuatan denah plate ELISA dan coating buffer. Denah dibuat berdasarkan kode sempel. Coating buffer dibuat fresh.

- Coating antigen dengan kadar antigen antigen yang digunakan adalah (1 : 40 ) diencerkan dengan coating buffer dan diinkubasi dengan suhu 4°C semalam.
- Dicuci plate menggunakan larutan PBS tween 0,2 % sebanyak 10 µl dan diulang 6 kali
- Ditambahkan 100 µl antibodi primer anti MTT (1: 400) dalam essay buffer
- Diinkubasi plate Elisa pada suhu ruang selama 2 jam sambil dishaker dengan shaker Elisa plate
- Pencucian dengan PBS tween 0,2 % sebanyak 200 µl dan diulang 6 kali
- Ditambahkan 100 µl antibodi sekunder igG biotin anti rabbit (1:800) dalam essay buffer lalu inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam sambil dishaker
- Dicipi dengan OBS Tween 0,2 % dan diulang 6 kali.
- Tambahkan 100 µl larutan SAHRP (1 : 800) dalam essay buffer lalu inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam sambil dishaker
- Dicuci dengan PBS Tween 0,2 % sebanyak 200 µl dan diulang 6 kali
- Tambahkan 100 µl masing masing – masing well substrat sure blue TMB microweel lalu inkubasi 20- 30 menit pada ruang gelap. Jika terjadi reaksi antara antigen dengan antibodi maka akan berubah menjadi biru
- Tambahkan 100 µl HCL 1 N sebagai stop reaksi. Pada tahapan ini larutan warna biru berubah menjadi kuning
- Dibaca dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm. Hasil absorbansi dikonveksikan dengan kurva standart dan diketahui nilai MT.

### **3.7 Analisa Kualitas Air**

#### **3.7.1 Suhu (SNI, 2005)**

Pengukuran suhu air dapat menggunakan alat yaitu thermometer Hg.

Prosedur pengukuran suhu dapat dilakukan dengan cara :



- Mencilupkan termometer Hg kedalam perairan.
- Membiarkan selama 2 sampai 5 menit.
- Membaca skala pada thermometer selama didalam air
- Mencatat hasil pengukuran dalam skala °C.

### **3.7.2 Derajat Keasaman (pH) (SNI, 2004)**

Alat yang digunakan adalah pH meter. Pengukuran pH dengan menggunakan pH meter meliputi :

- Kalibrasi pH meter dengan larutan peyangga.
- Keringkan elektroda (sensor) dengan menggunakan tissue
- Bilas elektroda (sensor) dengan aquades
- Celupkan elektroda kedalam air sampel sampai pH meter menunjukkan angka yang stabil
- Mencatat hasil pengukurannya.

### **3.7.3 DO (Dissolved Oxygen) (Mubarak et al., 2010)**

Suatu perairan dapat diukur kadar oksigen terlarutnya menggunakan DO meter. Mubarak et al., 2010), berpendapat bahwa prosedur penggunaan DO meter tipe DO- 5510 adalah sebagai berikut :

- Lepas sambungan kabel elektroda dari DO meter
- Basahi elektroda dengan aquades selama 2-3 menit dengan tujuan untuk mencuci elektroda
- Sambungkan kembali kabel elektroda dan lakukan kalibrasi
- Memasukan ujung elektroda kedalam perairan
- Mengatur tombol pilihan pada posisi O<sub>2</sub>- TEMP
- Menekan tombol RUN
- ditunggu sampai angka stabil dimana angka atas menunjukkan nilai DO dan mencatat hasilnya.

### 3.7.4 Salinitas (Wibisono, 2010)

Pada penelitian ini pengukuran salinitas dengan menggunakan salinometer. Wibisono (2010), menjelaskan bahwa prosedur pengukuran salinitas dengan salinometer yaitu :

- Menyiapkan salinometer
- Mengambil air dari perairan dan di masukkan ke dalam “ember”
- Mencilupkan salinometer ke dalam air sampel di dalam “ember”
- Mendingkannya selama ± menit
- Membaca skala pada salinometer
- Mencatat nilai hasil pengukuran dalam skala salinitas dalam satuan ppt

### 3.8 Analisa Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis regresi linier sederhana. Analisis regresi merupakan alat analisa yang mampu menjelaskan pola hubungan antara dua variabel atau lebih yang terdiri atas variabel independen (Y) dan variabel independen (X), sedangkan koefisien korelasi menunjukkan arah hubungan antara variabel X dan Y. Sujianto (2009), menyatakan bahwa regresi linier sederhana biasa digunakan untuk mengatasi permasalahan analisis regresi yang melibatkan hubungan dari variabel terikat

$$Y = a + bX$$

Keterangan :

a : Intersep atau perpotongan dengan sumbu tegak (y)

b : kmiringan atau gradient garis regresi

X : variabel bebas (kadar logam berat Pb pada tubuh tiram )