

3. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Kabupaten Blitar merupakan salah satu daerah di Propinsi Jawa Timur yang secara geografis Kabupaten Blitar terletak pada Secara astronomis Kabupaten Blitar terletak di $111^{\circ}40'$ - $112^{\circ}10'$ BT dan $7^{\circ}58'$ - $8^{\circ}9'51''$ LS. Kabupaten Blitar memiliki luas wilayah 1.588.79 km. Adapun batas – batas wilayah adalah sebagai berikut :

Sebelah Utara : Kabupaten Malang
 Sebelah Timur : Kabupaten Malang
 Sebelah Selatan : Samudra Hindia
 Sebelah Barat : Kabupaten Tulungagung

Di pantai Serang, Blitar Jawa Timur ada beberapa komunitas masyarakat yang didukung Penuh oleh Pemerintah Desa Serang Kecamatan Panggungrejo dan atas binaan Dinas Kelautan dan Perikanan Kabupaten Blitar serta pihak – pihak terkait melakukan kegiatan Konservasi Penyu. Kegiatan tersebut dilakukan dengan cara mengamankan telur penyu yang ada di pesisir Pantai Serang (yang biasanya diambil oleh tangan-tangan yang tidak bertanggung jawab) untuk kemudian di tetaskan di tempat yang lebih aman, selanjutnya anak penyu (tukik) ditangkap beberapa hari sampai siap untuk dilepas ke perairan laut.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian di Pantai Serang, Kab. Blitar, Jawa Timur ini terdiri dari alat lapang dan laboratorium, dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Alat yang digunakan penelitian di lapang dan di labotarturium.

Alat Lapang	Alat Laboratorium
<ul style="list-style-type: none"> • Conical Tube • Kertas Label 	<ul style="list-style-type: none"> • Cawan Petri • Rak Tabung Reaksi

-
- Salinometer
 - Do meter
 - Cool Box
 - pH meter
- Tabung Reaksi
 - Gelas Ukur 100 ml
 - Erlenmayer
 - Timbangan Digital
 - Autoklaf
 - Laminar Airflow
 - Vortex Mixer
 - Inkubator
 - Mikroskop
 - Mikropipet
 - Bunsen
 - Jarum Ose
 - Colony Counter
 - Pipet Volume
 - Bola Hisap
 - Hot Plate
 - Cawan Porselen
 - Buret
 - Statif
 - Spatula
 - Beaker Glass
 - Nampan
-

Bahan yang digunakan dalam penelitian di Pantai Serang, Kab. Blitar, Jawa Timur ini terdiri dari alat lapang dan laboratorium. Bahan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Bahan yang digunakan di Lapang dan Laboratorium

Bahan Lapang	Bahan Laboratorium
<ul style="list-style-type: none"> • Penyu Sisik • Cotton swab • Es batu 	<ul style="list-style-type: none"> • Aquades • Alumunium foil • TSA • NaCl • Kertas label • PCA • Kristal ungu • Iodium • Saffranin • TSA • Air sampel • Kertas Labe • Alkohol 70%

-
- Kapas
 - Tisu
-

3.3 Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan analisa sampel secara *in-situ* dan *ex-situ*. Analisa secara *in-situ* dilakukan di lokasi penelitian yaitu Pantai Serang, Kab. Blitar, sedangkan analisa sampel secara *ex-situ* yaitu sampel yang diambil dari lokasi penelitian dianalisis di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Menurut Makmur *et al.*, (2009), pengukuran kualitas perairan meliputi pengukuran *in-situ* dan *ex-situ*. Secara *in-situ* parameter yang diukur adalah salinitas, ph, suhu dan kandungan oksigen terlarut. Sedangkan secara *ex-situ* yaitu pengukuran kimia perairan dan identifikasi bakteri dan ektoparasit yang dilakukan di lingkungan laboratorium. Parameter yang diamati dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Parameter yang diamati.

Parameter	Pengukuran	Keterangan
Suhu (°C)	Thermometer	<i>In-situ</i>
pH	ph meter	<i>In-situ</i>
DO (ppm)	Do meter	<i>In-situ</i>
Salinitas	Salinometer	<i>In-situ</i>
Amonia (ppm)	Spektrofotometer	<i>Ex-situ</i>
Identifikasi Bakteri	Pewarnaan	<i>Ex-situ</i>

3.4 Metode Sampling

Menurut Nurhayati (2008), penarikan sampel secara acak memiliki ciri-ciri setiap anggota populasi mempunyai kesempatan yang sama untuk terpilih sebagai sampel, pemilihan sampel bersifat objektif, estimasi parameter dapat dilakukan, bias dapat diperkirakan. Beberapa teknik penarikan sampel dengan

probability sampling adalah sampling acak sederhana, sampling acak sistematis, dan sampling acak berlapis.

Menurut Sumanto (2012), teknik sampling merupakan hal yang penting dalam sebuah penelitian. Keterwakilan populasi oleh sampel sangat dipengaruhi oleh teknik pemilihan sampel yang digunakan. Teknik pemilihan sampel yang digunakan harus sesuai dengan kondisi populasi yang sebenarnya. Kesalahan dalam pemilihan teknik sampling akan dapat memberikan hasil yang kurang akurat.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini pertama dengan melakukan sterilisasi alat, mengambil bakteri di air laut, air kolam penangkaran tukik dan dibadan tukik. Kemudian dilakukan pengukuran parameter lingkungan perairan di setiap lokasi penelitian. Setelah itu sampel bakteri yang telah diambil dianalisis di laboratorium. Prosedur penelitian dijelaskan sebagai berikut :

3.5.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi merupakan proses yang menghancurkan semua bentuk kehidupan suatu benda yang steril dipandang dari sudut mikrobiologi, artinya bebas dari mikroorganisme hidup pada proses sterilisasi, spora bakteri adalah yang paling resisten diantara semua organisme hidup (Pelczar dan Chan, 1988). Sterilisasi alat adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat pada atau di dalam suatu benda. Sterilisasi yang dilakukan adalah sterilisasi basah menggunakan autoklaf. Hal yang pertama dilakukan adalah membungkus alat yang akan dibuat dalam menumbuhkan bakteri. Cawan petri, beaker glass dan tabung erlrmayer yang akan disteriliasi terlebih dahulu dibungkus dengan kertas koran dan ditata dengan rapi, setelah terbungkus dengan rapi dengan kertas koran maka alat yang akan disteriliasi dimasukkan

kedalam autoklaf dan ditunggu sampa suhu pada autoklaf menunjukkan angka 121°C.

3.5.2 Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil meliputi sampel air laut, air kolam dan hewan (penyu). Pengambilan dilakukan secara acak atau *random*. Random sampling adalah suatu metode sederhana dalam pengambilan sampel suatu populasi yang dilakukan secara acak tanpa memperhatikan strata yang ada dalam populasi itu (Sugiyono, 2009). Saat pengambilan sampel di penyu diharuskan dengan metode khusus karena penyu termasuk hewan yang dilindungi. Untuk pengambilan sampel hewan yang dilindungi salah satunya adalah dengan metode swab. Prinsip dari metode swab ini adalah menggosokkan *cotton swab* pada permukaan kulit penyu kemudian dimasukkan kedalam larutan Na fisiologis. Menggunakan Na fisiologis karena larutan ini mengandung elektrolit yang mampu menjaga keseimbangan cairan didalam dan diluar sel. Menurut Mulyani *et al.*, (2014), metode di *swab* adalah metode yang digunakan untuk mengambil sampel pada organisme yang dilindungi. Prinsip dari metode swab ini adalah menggosokkan *cotton swab* pada permukaan kulit organisme yang akan diamati.

3.5.3 Pembuatan Media Tumbuh Bakteri

Langkah awal dalam pembuatan media TSA adalah menimbang media TSA yang akan digunakan kemudian masukan kedalam erlenmayer selanjutnya tambahkan aquades sesuai dengan aquades kemudian homogenkan. Erlenmayer mayer ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan pada hot palte hingga mendidih selanjutnya dibungkus kertas dan diikat rapat , kemudian dimasukkan kedalam autoclave selama 15 menit dan didapatkan hasil media TSA steril.

3.5.4 Pengenceran

Pengenceran biasanya dilakukan secara desimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000 dan seterusnya. Pengenceran memudahkan dalam perhitungan koloni, sedangkan pengenceran yang bukan desimal, misal 1:5, 1:25 dan seterusnya jarang dilakukan karena tidak praktis dalam perhitungan (Fardiaz, 1993 dalam Evan 2009). Langkah awal pengenceran adalah ambil 1 ml sampel kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi 1 dan dicatat sebagai 10^{-1} , kemudian diambil 1 ml dari tabung reaksi 1 dan dimasukkan di tabung reaksi 2 dan dicatat sebagai 10^{-2} langkah ini dilakukan sampai tabung reaksi ke 8 atau dicatat sebagai 10^{-8}

3.5.5 Penanaman

Langkah awal yang dilakukan adalah memasukan sampel yang telah diencerkan sebanyak 1ml kedalam cawan petri penanaman ini dilakukan secara duplo. Selanjutnya masukkan media TSA sebanyak 15-20 ml pada cawan petri. Kemudian didinginkan sampai beku lalu balik cawan petri. Setelah itu dibungkus dengan kertas koran dan diikat dengan benang dan diinkubasi dalam incase selama kurang lebih 24 jam.

3.5.6 Uji Total Plate Count (TPC)

Salah satu cara untuk menghitung jumlah koloni mikroba adalah dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Cawan petri yang telah diinkubasi selama kurang lebih 24 jam diambil dari inkubator. Bila dalam cawan petri terdapat sedikit koloni maka dapat dihitung secara manual, lain halnya jika koloni yang tumbuh banyak maka perhitungan dilakukan dengan menggunakan *colony counter*. Rumus yang digunakan untuk perhitungan total koloni mikroba adalah sebagai berikut :

$$\text{TPC} = \text{Jumlah koloni dalam cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}} = \dots\dots \text{CFU/ml}$$

3.5.7 Isolasi

Dalam kegiatan mikrobiologi pembuatan isolat dilakukan dengan cara mengambil sampel mikrobiologi dari lingkungan yang ingin diteliti. Dari sampel tersebut kemudian dibiakkan dengan menggunakan media universal atau media selektif, tergantung tujuan yang ingin dicapai. Jika menggunakan media universal akan diperoleh biakan mikroba campuran. Untuk proses identifikasi maupun isolasi jenis tertentu saja, dilakukan proses pembuatan isolat tunggal dari isolat campuran tersebut. Isolat tunggal atau biakan murni merupakan biakan yang asalnya dari pembelahan satu sel tunggal. Langkah untuk melakukan proses isolasi adalah panaskan jarum loop diatas Bunsen, kemudian ambil 1 sel bakteri dengan menggunakan jarum loop, goreskan pada medium isolasi dengan metode zig-zag. Bungkus dengan Koran dan diikat dengan tali kemudian di inkubasi dalam incase selama 24 jam.

Isolasi bakteri dilakukan secara aseptik di *Laminar flow* dengan teknik cawan gores, yaitu dengan menusukkan jarum ose yang steril ke dalam cawan yang tumbuh bakteri. Kemudian diisolasi ke media TSA yang telah disediakan selanjutnya dibungkus dengan menggunakan kertas padi dalam posisi terbalik dan diinkubasi dalam inkubator selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam didapatkan koloni-koloni bakteri yang tumbuh di media TSA, kemudian diisolasi kembali ke media TSA yang lain untuk mendapatkan biakan murni. Tujuan dari pemurnian ini adalah untuk memisahkan bakteri yang satu dengan yang lainnya sehingga didapatkan koloni yang seragam (sejenis). Koloni yang sudah murni diisolasi kembali ke media miring dan diinkubasi lagi untuk dilakukan identifikasi bakteri.

3.5.8 Uji Gram (Pewarnaan)

Hal pertama yang harus dilakukan adalah menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk uji gram pada bakteri. Langkah awal yaitu ambil bakteri yang telah diisolasi dengan menggunakan jarum loop. Gesekkan jarum loop yang berisi bakteri pada kaca objek kemudian fiksasi kaca obyek tersebut diatas bunsen. Preparat yang telah difiksasi ditetesi dengan kristal ungu dan didiamkan selama 1 menit selanjutnya bilas dengan aquades, kemudian tetesi dengan iodium dan didiamkan selama 2 menit. Bilas dengan aquades, kemudian cuci dengan menggunakan etanol 70%, selanjutnya bilas dengan aquades kembali dan tetesi dengan safranin dan diamkan selama 0,5 menit bilas dengan aquades dan amati preparat dibawah mikroskop.

3.5.9 Analisis Morfologi Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah bakteri isolat yang berasal dari sampel penyusut. Pemisahan dan pemurnian antara bentuk coccus dan batang dilakukan berdasarkan pengamatan morfologik secara mikroskopik dengan "Olympus Biological Microcope CH2 Series, no. 5L0149 yang dilengkapi dengan automatic *Exposure Photomicrograph type PM-10AK3*". Isolat yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya dikembangkan dengan media kultur menurut prosedur OGIMOTO dan IMAI (1981) yang dimodifikasi (Thalib *et al.*, 2000).

3.5.10 Uji Statistik

Analisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah analisis PCA (*Principle Component Analysis*) dan analisis korelasi person. Pemaparan selengkapnya dijelaskan pada sub-bab berikut :

a. Analisis PCA (*Principle Component Analysis*)

Prosedur PCA pada dasarnya adalah bertujuan untuk menyederhanakan variabel yang diamati dengan cara menyusutkan (Mereduksi) dimensinya. Hal ini

dilakukan dengan cara menghilangkan korelasi diantara variabel bebas melalui transformasi variabel bebas asal ke variabel baru yang tidak berkorelasi sama sekali atau yang biasa disebut dengan *principal component*. Analisis komponen utama yang dilakukan pada penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hubungan dari pada kolam pengambilan data dengan nilai parameter lingkungan.

b. Analisis Korelasi Pearson

Dalam analisis korelasi, terdapat tiga korelasi sederhana yang dapat digunakan yaitu *Pearson Correlation*, *kendall's tau-b* dan *Speaman Correlation*. *Pearson Correlation* merupakan korelasi yang digunakan untuk data berskala interval atau rasio sedangkan *Kendall's tau-b* dan *Speaman Correlation* biasa digunakan untuk data berskala ordinal. Pada penelitian korelasi yang digunakan adalah *Pearson Correlation*. Analisis korelasi *pearson* bertujuan untuk mengetahui nilai signifikansi dari suatu variabel, dimana pada penelitian ini korelasi *pearson* bertujuan untuk mengetahui hubungan antara parameter lingkungan dengan parameter lingkungan dan parameter lingkungan dengan jumlah bakteri.

3.6 Pengukuran Kualitas Perairan

3.6.1 Oksigen Terlarut

Do diukur dengan metode elektrometik menggunakan DO meter yaitu *Probe* disambungkan sebelum mengoperasikan DO meter, *Probe* dimasukkan kedalam air sampel yang diukur lalu tombol *on* ditekan pada layar akan muncul, *cond* ditunggu beberapa detik, maka pada layar akan muncul angka-angka. *Cal* ditekan 2 kali, ditekan *range* maka alat akan mengukur DO serta dicatat hasilnya. Setelah selesai, tombol *off* ditekan untuk mematikan alat dan *Probe* dicuci dengan akuades dan ditutup.

3.6.2 Suhu

Suhu perairan diukur dengan alat DO meter, dikarenakan alat ini mengukur kadar oksigen dalam air sekaligus mengukur suhu. Cara penggunaannya sama dengan pengukuran oksigen terlarut.

3.6.3 pH

pH diukur menggunakan pH meter dengan prosedur pengukuran yaitu *Probe* disambungkan terlebih dahulu sebelum digunakan, *Probe* dibilas dan dikalibrasi menggunakan akuades (pH netral) lalu *Probe* dimasukkan ke dalam air sampel yang diukur. Setelah itu, tekan tombol *on* dan tunggu sampai muncul angka pada layar pH meter, angka yang muncul ditunggu sampai muncul angka pada layar pH meter, angka yang muncul ditunggu sampai posisi stabil. Setelah selesai, tombol *off* ditekan untuk mematikan alat dan *Probe* dicuci dengan akuades lalu ditutup.

3.6.6 Salinitas

Salinitas merupakan kadar garam pada perairan laut, pada perairan laut salinitas dipengaruhi oleh hujan, arus, dan penguapan. Pengukuran salinitas pada penelitian ini menggunakan salinometer.

3.6.7 Amonia

Pengukuran amonia diujikan di Laboaturium Kimia, Universitas Brawijaya Malang. Sampel diambil dengan botol air mineral kemudian sampel ditaruh dalam *cool box* yang berisi es batu, hal ini dilakukan untuk menjaga kualitas sampel agar tidak rusak.

3.7 Parameter Uji

3.7.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data diperoleh dari hasil identifikasi bakteri pada lingkungan tempat pemeliharaan dan perairan umum serta bakteri yang terdapat pada penyu.

3.7.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah kualitas air yaitu suhu, pH, Oksigen terlarut, CO₂, dan Salinitas, yang diukur pada perairan umum dan lingkungan tempat pemeliharaan penyu. Pengukuran kualitas air ini dibedakan menjadi 2 yaitu secara *in-situ* dan *ek-situ*.

