

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi Penelitian

Trenggalek merupakan salah satu Kabupaten di Jawa Timur yang memiliki banyak pantai yang sering dijadikan tempat untuk bertelur bagi penyu. Maka tidak heran banyak pengelolaan konservasi penyu ada di Trenggalek, salah satunya di Pantai Taman Kili-kili. Pantai Kili-kili sering dijadikan penyu sebagai tempat peneluran karena karakteristik pantainya yang cocok untuk penyu bertelur, serta disepanjang pantainya ditumbuhi dengan vegetasi *Pandanus tectorius* yang terbukti dapat merangsang penyu untuk meletakkan telur-telurnya di pantai yang ditumbuhi dengan vegetasi ini. Kondisi pantai yang gelap dan sunyi karena jauh dari pemukiman warga juga menjadi salah satu faktor yang membuat pantai ini sering ditemukan penyu bertelur.

##### A. Letak Geografis dan Topografis

Konservasi Penyu Taman Kili-kili terletak di Kabupaten Trenggalek yang secara geografis berada diantara koordinat 111°11' Bujur Timur dan 7°53'-8°34' Lintang Selatan dengan kondisi dua pertiga dari luas wilayahnya merupakan pegunungan dengan ketinggian 0 – 690 dpl. Secara administratif terletak di daerah Desa Wonocoyo Kecamatan Panggul Kabupaten Trenggalek, Jawa Timur. Adapun batas-batas wilayah adalah sebagai berikut :

Sebelah Utara : Kabupaten Ponorogo

Sebelah Timur : Kabupaten Tulungagung

Sebelah Selatan : Samudra Hindia

Sebelah Barat : Kabupaten Ponorogo dan Pacitan

##### B. Geofisik Pantai Peneluran Kili-kili

Pantai Kili-kili merupakan pantai yang landai dengan panjang pantai ± 4,3 km, kelerengan pantai sekitar 20° dengan lebar antara 20 hingga 30 m, tekstur

pantainya berupa pasir koral kurang lebih 90% dan sisanya adalah debu maupun liat berwarna putih kekuningan serta bertekstur halus (Budiono, 2011).

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian di Pantai Kili-kili, Trenggalek, Jawa Timur ini terdiri dari alat lapang dan laboratorium. Alat yang digunakan penelitian dilapang dan laboratorium dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Alat yang digunakan Penelitian Lapang dan Laboratorium.

Alat Lapang	Alat Laboratorium
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Botol Film</li> <li>• Kertas Label</li> <li>• Salinometer</li> <li>• Do meter</li> <li>• Cool Box</li> <li>• pH meter</li> <li>• Current Meter</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cawan Petri</li> <li>• Rak Tabung Reaksi</li> <li>• Tabung Reaksi</li> <li>• Gelas Ukur 100 ml</li> <li>• Erlenmayer</li> <li>• Timbangan Digital</li> <li>• Autoklaf</li> <li>• Laminar Airflow</li> <li>• Vortex Mixer</li> <li>• Inkubator</li> <li>• Mikroskop</li> <li>• Mikropipet</li> <li>• Bunsen</li> <li>• Jarum Ose</li> <li>• Colony Counter</li> <li>• Pipet Volume</li> <li>• Bola Hisap</li> <li>• Hot Plate</li> <li>• Spatula</li> <li>• Beaker Glass</li> <li>• Nampan</li> </ul>

Bahan yang digunakan dalam penelitian di Pantai Kili-Kili, Trenggalek, Jawa Timur ini terdiri dari alat lapang dan laboratorium. Bahan yang digunakan penelitian dilapang dan laboratorium dapat dilihat pada Tabel 2.



**Tabel 2.** Bahan yang digunakan Penelitian Lapang dan Laboratorium.

Bahan Lapang	Bahan Laboratorium
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Penyus</li> <li>• Cotton swab</li> <li>• Es batu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aquades</li> <li>• Alumunium foil</li> <li>• PDA</li> <li>• NaCl</li> <li>• Kertas label</li> <li>• PCA</li> <li>• Kristal ungu</li> <li>• Iodium</li> <li>• Saffranin</li> <li>• TSA</li> <li>• Indikator PP</li> <li>• Air sampel</li> <li>• Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub></li> <li>• KMnO<sub>4</sub></li> <li>• H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>• Na-Oksalat</li> <li>• Larutan Nesler</li> <li>• Kertas Label</li> <li>• Alumunium Foil</li> <li>• NH<sub>4</sub>OH</li> <li>• Asam Fenol Disulfonik</li> <li>• SnCl<sub>2</sub></li> </ul>

### 3.3 Metode Pengambilan Data

Penelitian ini menggunakan analisa sampel secara *in-situ* dan *ex-situ*. Analisa secara *in-situ* dilakukan di lokasi penelitian yaitu Pantai Kili-kili, sedangkan analisa sampel secara *ex-situ* yaitu sampel yang diambil dari lokasi penelitian dianalisis di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan 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 *ek-situ* yaitu pengukuran kimia perairan dan identifikasi bakteri dan ektoparasit yang

dilakukan di lingkungan laboratorium. Alat dan metode dapat dilihat pada Tabel

3.

**Tabel 3.** Parameter yang diamati

Parameter	Alat 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	Biokimia	<i>Ex-situ</i>

### 3.4 Metode Sampling

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. Apabila hal ini terjadi maka hasil penelitian akan diragukan kebenarannya. Teknik sampling dalam penelitian dibedakan menjadi 2 kelompok yaitu teknik sampling acak dan teknik sampling non acak. Teknik sampling acak dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu acak sederhana, acak bertingkat dan acak kelompok (Sumanto, 2012).

### 3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini pertama dengan melakukan sterilisasi alat, mengambil sampel parasit dan bakteri di 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, 1986 dalam Dadjit *et al.*, 2007). 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 digunakan dalam menumbuhkan bakteri. Cawan petri, beaker glass dan tabung erlrmayer yang akan disterilisasi terlebih dahulu dibungkus dengan kertas koran dan ditata dengan rapi, setelah terbungkus dengan rapi dengan kertas koran maka alat yang akan disterilisasi dimasukkan kedalam autoklaf dan ditunggu sampai suhu pada autoklaf menunjukkan angka 115°C.

### 3.5.2 Pengambilan Sampel

Hal yang dilakukan dalam pengambilan sampel adalah menentukan jenis sampel yang akan diambil harus mencakup semua aspek yang berhubungan dengan topik penelitian. 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 (Sugiono, 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.

### 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 alumunium foil dan dipanaskan pada hot palte hingga mendidih selanjutnya dibungkus kertas dan diikat rapat , kemudian masukkan 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  $10^{-1}$  langkah ini dilakukan sampai tabung reaksi ke 5 atau dicatat sebai  $10^{-5}$ .

Prosedur pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 2

### 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 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.

### 3.5.7 Analisis Morfologi Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah bakteri isolat yang berasal dari sampel penyu Lekang (*Lepidochelys olivaceae*).Pemisahann 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 dikembangbiakan dengan media kultur menurut prosedur OGIMOTO dan IMAI (1981) yang dimodifikasi (Thalib, 2000) untuk disiapkan menjadi sediaan inkulum

### 3.5.8 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 kolom 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 ordila. 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

Oksigen terlarut 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. Menurut Ohoiulun (2003), konsentrasi oksigen terlarut dipertahankan diatas 4 ppm dengan adanya aerasi. Satuan yang dipakai adalah ppm. Oksigen terlarut diukur langsung di lapang.

#### 3.6.2 Suhu

Suhu perairan diukur dengan alat DO meter, dikarenakan alat ini mengukur kadar oksigen dalam air sekaligus mengukur suhu. Cara peggunaanya sama dengan pengukuran oksigen terlarut. Menurut Ohoiulun (2003), parameter suhu diamati tiap hari dengan menggunakan *thermometer celcius*. Pengukuran suhu dilakukan dua kali sehari yaitu pada pukul 06.00 untuk mengetahui suhu minumum dan pukul 15.00 untuk mengetahui suhu maksimum.

#### 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.

#### 3.6.4 Amonia

Pembuatan larutan baku ammonium  $\text{NH}_4$  yaitu pipet 0, 250, 500, 1000 dan 2000  $\mu\text{l}$  larutan induk ammonium dan masukkan masing-masing ke dalam labu ukur 500 ml dan tambahkan air suling sampai tepat pada tanda tera sehingga diperoleh kadar ammonium sebesar 0,0; 0,5; 1,0 dan 4,0  $\text{mg/L NH}_4\text{-N}$ . Kemudian cara mengujinya adalah pipet 50 ml benda uji kemudian masukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml, tambahkan 1 ml larutan nessler, kocok dan biarkan larutan tersebut bereaksi selama  $\geq 10$  menit lalu masukkan ke dalam cuvet pada alat spektrofotometer, baca dan catat serapan masuknya (panjang gelombang 425 nm).

