

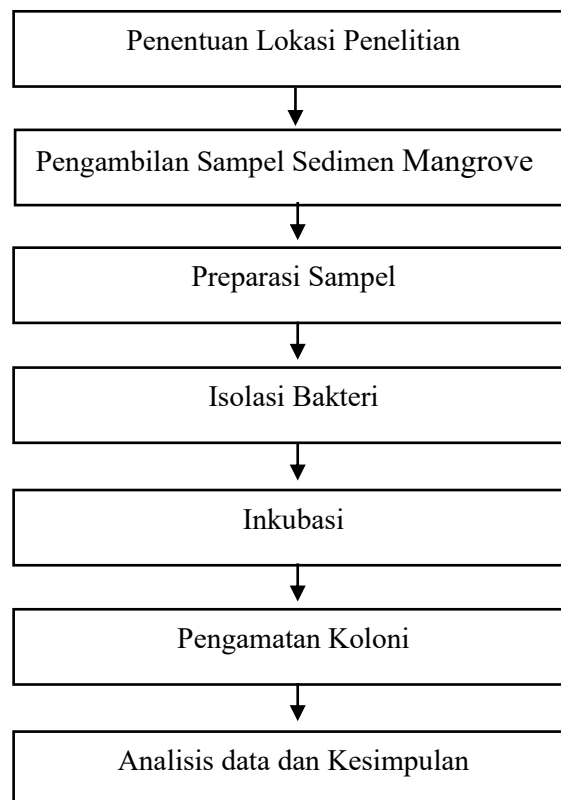
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif dengan pendekatan laboratorik. Penelitian deskriptif digunakan untuk menggambarkan karakteristik bakteri indigenous yang di temukan di Hutan Mangrove Ngurah Rai Bali, sedangkan pendekatan eksploratif dilakukan untuk menemukan jenis bakteri yang terdapat di sedimen.

B. Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan penentuan lokasi penelitian pada ekosistem mangrove di Bali, yaitu Hutan Mangrove Ngurah Rai, sebagai lokasi pengambilan

sampel sedimen. Selanjutnya, sampel sedimen mangrove diambil pada beberapa titik pengamatan dengan kedalaman tertentu menggunakan alat yang steril. Sampel sedimen yang telah dikumpulkan kemudian dibawa ke laboratorium terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar untuk dilakukan preparasi oleh petugas laboratorium, meliputi homogenisasi dan pengenceran bertingkat.

Tahap berikutnya yang dilakukan petugas laboratorium isolasi bakteri indigenous dengan menumbuhkan sampel sedimen pada media pertumbuhan menggunakan metode yang sesuai, kemudian dilakukan inkubasi hingga koloni bakteri tumbuh. Koloni bakteri yang muncul selanjutnya diamati dan dihitung untuk mengetahui jumlah koloni, serta diidentifikasi secara makroskopis berdasarkan karakteristik morfologi koloni seperti bentuk, warna, tepi, dan permukaan koloni. Data hasil pengamatan kemudian diolah dan dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan karakteristik bakteri indigenous yang terdapat pada sedimen ekosistem mangrove, selanjutnya ditarik kesimpulan berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Kawasan Hutan Mangrove Ngurah Rai Bali, yang berlokasi di Jl. Tanah Kilap, Pomogan, Denpasar Selatan, kota Denpasar, Bali, yang dikelola oleh UPTD. Tahura Ngurah Rai, dan pengukuran sampel akan dilakukan pada lab terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dari penyusunan proposal sampai presentasi hasil adalah Bulan Januari – Mei 2026. Selanjutnya dilakukan preparasi sampel, pencampuran

sedimen dengan media karbon serta plastik dengan jenis PLA dan PET, kemudian di inkubasi selama 7 hari

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh bakteri yang terdapat pada sedimen ekosistem Hutan Mangrove Ngurah Rai Bali yang berpotensi dalam mendegradasi mikroplastik. Bakteri tersebut merupakan bakteri indigenous yang hidup secara alami di lingkungan mangrove dan berperan dalam proses biodegradasi bahan pencemar, khususnya mikroplastik.

Populasi penelitian ini tidak dapat dihitung secara pasti jumlahnya, sehingga populasi didefinisikan sebagai seluruh komunitas bakteri yang terdapat pada sedimen mangrove di lokasi penelitian. Sedimen akan di ambil menggunakan spatula atau skop kecil dengan mentancapkan skop atau spatula tegak lurus dengan kedalaman $\pm 5-10$ cm ke sedimen dan masukan ke kantung plastik atau botol sampel yang sudah steril dan hidari bersentuhan dengan tangan, tutup plastik atau botol sampel dan isi dengan label tempat mengambil dan masukan ke cool box.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sedimen mangrove yang diambil dari Hutan Mangrove Ngurah Rai Bali serta isolat bakteri hasil isolasi dari sedimen tersebut yang berpotensi dalam mendegradasi mikroplastik.

Pengambilan sampel sedimen dilakukan pada tiga titik lokasi berbeda di kawasan Hutan Mangrove Ngurah Rai Bali yang diduga memiliki paparan mikroplastik. Pada setiap titik lokasi diambil sedimen mangrove pada kedalaman

$\pm 5\text{--}10$ cm . Setiap titik pengambilan diambil sebanyak ± 200 gram sedimen dan dimasukkan ke dalam wadah steril.

Teknik pengambilan sampel menggunakan purposive sampling, yaitu pengambilan sampel secara sengaja pada lokasi yang dekat dengan aktivitas manusia, seperti area jalur perahu, pemukiman sekitar mangrove, atau aliran air yang berpotensi membawa limbah plastik.

Sedimen yang telah diambil kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi bakteri. Isolat bakteri yang berhasil ditumbuhkan dan dimurnikan selanjutnya digunakan sebagai sampel penelitian untuk dilakukan identifikasi bakteri dan pengujian potensi degradasi mikroplastik.

Kriteria Sampel:

- a. Sedimen berasal dari kawasan Hutan Mangrove Ngurah Rai Bali.
- b. Sedimen diambil pada lokasi yang berpotensi tercemar mikroplastik.
- c. Identifikasi bakteri yang berpotensi dalam mendegradasi mikroplastik.

Jumlah dan Penentuan Titik Pengambilan Sampel.

1) Titik Hulu

Titik hulu merupakan area mangrove yang berada di bagian awal aliran perairan dan relatif lebih dekat dengan daratan. Lokasi ini berpotensi menerima mikroplastik yang berasal dari aktivitas darat dan aliran sungai

2) Titik Tengah

Titik tengah merupakan area mangrove yang berada di bagian tengah kawasan mangrove. Titik ini menggambarkan kondisi peralihan antara hulu dan hilir, serta memungkinkan terjadinya akumulasi mikroplastik akibat pergerakan air pasang dan surut.

3) Titik Hilir

Merupakan area mangrove yang berada di bagian akhir aliran perairan dan lebih dekat dengan laut. Lokasi ini berpotensi menjadi tempat pengendapan mikroplastik yang terbawa dari hulu dan tengah kawasan mangrove.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer adalah data yang diperoleh langsung oleh peneliti dari lapangan dan laboratorium adalah mampu mengetahui dan mengidentifikasi bakteri pendegradasi mikroplastik di Hutan Mangrove Ngurah Rai Bali

b. Data sekunder

Data sekunder adalah data pendukung yang di peroleh dari buku dan jurnal ilmiah yang berkaitan dengan mikroplastik dan bakteri pendegradasi mikroplastik, dan data umum mengenai kawasan Hutan Ngurah Rai Bali.

2. Cara Pengumpulan data

a. Jenis dan Pendekatan Sampling

Penelitian ini menggunakan teknik purposive sampling, yaitu pengambilan sampel secara sengaja berdasarkan pertimbangan tertentu yang sesuai dengan tujuan penelitian. Teknik ini dipilih karena penelitian berfokus pada sedimen mangrove yang berpotensi mengandung bakteri indigenous.

b. Lokasi dan Titik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada ekosistem mangrove di Bali, misalnya kawasan Hutan Mangrove Ngurah Rai.

Pada lokasi penelitian ditentukan beberapa titik pengambilan sampel yang mewakili kondisi lingkungan mangrove. Penentuan titik dilakukan dengan mempertimbangkan area dengan tutupan mangrove aktif Sedimen yang selalu tergenang atau terpengaruh pasang surut aksesibilitas dan keamanan lokasi.

c. Jenis sampel

Sampel penelitian berupa sedimen mangrove, karena sedimen merupakan habitat utama bakteri indigenous dan tempat akumulasi bahan organik.

d. Kedalaman pengambilan sampel

Sedimen diambil pada kedalaman 0–5 cm dari permukaan sedimen. Kedalaman ini dipilih karena merupakan lapisan aktif yang kaya mikroorganisme.

Prosedur Pengambilan Sampel

- 1) Peneliti menggunakan sarung tangan sekali pakai sebelum pengambilan sampel.
- 2) Sedimen diambil menggunakan sekop kecil atau corer sedimen secara tegak lurus.
- 3) Sedimen yang diperoleh dipindahkan ke dalam wadah sampel steril menggunakan spatula steril.
- 4) Setiap sampel diberi label yang berisi kode sampel, lokasi, tanggal pengambilan, dan kedalaman sedimen.

e. Jumlah sampel

Jumlah sampel disesuaikan dengan kebutuhan penelitian dan ketersediaan lokasi, dengan pengambilan sampel dilakukan pada beberapa titik untuk menggambarkan kondisi umum bakteri indigenous di sedimen mangrove.

f. Penyimpanan dan transportasi sampel

Sampel sedimen yang telah dikumpulkan disimpan dalam cooler box untuk menjaga kondisi sampel selama transportasi. Sampel kemudian dibawa ke laboratorium dan segera diproses untuk tahap isolasi bakteri.

g. Upaya pencegahan kontaminasi

Untuk menghindari kontaminasi:

- 1) Alat pengambilan sampel dibersihkan atau disterilkan sebelum digunakan
- 2) Sarung tangan diganti setiap berpindah titik sampel
- 3) Wadah sampel ditutup rapat setelah pengisian

h. Pembuat media dan pengecekan sampel

- 1) Mineral Salt Medium (MSM)

Alat

- a) Timbangan analitik
- b) Gelas beaker
- c) Gelas ukur
- d) Labu ukur 1000 mL
- e) Spatula
- f) Batang pengaduk / magnetic stirrer
- g) Pipet tetes
- h) pH meter atau kertas pH
- i) Botol media
- j) Autoklaf

Bahan

- a) KH_2PO_4 sebanyak 1,0 g

- b) K_2HPO_4 sebanyak 1,0 g
- c) NH_4NO_3 atau NH_4Cl sebanyak 1,0 g
- d) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sebanyak 0,2 g
- e) $CaCl_2$ sebanyak 0,02 g
- f) $FeSO_4$ (opsional) sebanyak 0,01 g
- g) $NaCl$ sebanyak 0,5–1 g
- h) Aquadest hingga 1000 mL

Cara Pembuatan

- a) Timbang seluruh bahan sesuai komposisi yang telah ditentukan.
- b) Masukkan sekitar 800 mL aquadest ke dalam gelas beaker.
- c) Larutkan bahan satu per satu sambil diaduk hingga homogen.
- d) Tambahkan aquadest hingga volume mencapai 1000 mL.
- e) Periksa pH media dan sesuaikan pada pH netral (± 7) bila diperlukan.
- f) Masukkan media ke dalam botol media.
- g) Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit.
- h) Dinginkan media hingga siap digunakan.

2) Isolasi Sampel

Alat

- a) Timbangan analitik
- b) Gelas beaker
- c) Gelas ukur
- d) Erlenmeyer / botol kultur
- e) Spatula

- f) Batang pengaduk / magnetic stirrer
- g) Gunting atau cutter steril
- h) Pinset
- i) Mikropipet / pipet ukur
- j) Autoklaf
- k) Inkubator

Bahan

- a) Mineral Salt Medium (MSM) sebanyak 30 mL
- b) Plastik PLA/PET sebanyak 0,3 gram
- c) Sampel sedimen/tanah mangrove sebanyak 0,3 gram
- d) Aquadest steril
- e) Alkohol 70%

Cara Pembuatan

- a) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses isolasi.
- b) Potong plastik PLA/PET menjadi ukuran kecil menggunakan gunting atau cutter steril.
- c) Masukkan 30 mL Mineral Salt Medium (MSM) ke dalam erlenmeyer atau botol kultur steril. Tambahkan plastik PLA/PET sebanyak 0,3 gram ke dalam media MSM sebagai sumber karbon.
- d) Masukkan sampel sedimen atau tanah mangrove sebanyak 0,3 gram ke dalam media.
- e) Homogenkan campuran secara perlahan agar sampel tercampur merata dengan media.
- f) Tutup erlenmeyer atau botol kultur menggunakan kapas atau penutup steril.

- g) Inkubasi sampel pada suhu dan waktu 10 hari yang telah ditentukan untuk mendukung pertumbuhan bakteri pendegradasi plastik.

3) Nutrient Agar (NA)

Alat

- a) Gelas beaker
- b) Gelas ukur
- c) Timbangan analitik
- d) Hot plate/magnetic stirrer
- e) Batang pengaduk
- f) Autoklaf
- g) Cawan petri
- h) Tabung reaksi
- i) Pipet ukur

Bahan

- a) Serbuk NA : 11,2 g
- b) Aquades : 400 mL

Cara Pembuatan

- a) Menimbang 11,2 g serbuk NA.
- b) Melarutkan NA ke dalam 400 mL aquades.
- c) Memanaskan sambil diaduk hingga larut homogen.
- d) Mensterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- e) Menuangkan media ke dalam 20 cawan petri masing-masing ±20 mL.
- f) Membiarkan media hingga memadat.

4) Pewarnaan Gram dan Pengecekan di Mikroskop

Alat

- a) Mikroskop
- b) Kaca objek dan kaca penutup
- c) Jarum ose
- d) Lampu spiritus / bunsen
- e) Pipet tetes
- f) Rak pewarnaan
- g) Pinset
- h) Tisu atau kertas serap

Bahan

- a) Isolat bakteri hasil pemurnian
- b) Aquadest steril
- c) Pewarna kristal violet
- d) Larutan lugol (iodine)
- e) Alkohol 96%
- f) Safranin
- g) Minyak imersi

Cara Pewarnaan Gram dan Pengamatan Mikroskop

- a) Bersihkan kaca objek, kemudian beri label sesuai sampel.
- b) Ambil sedikit isolat bakteri menggunakan jarum ose steril lalu campurkan dengan setetes aquadest pada kaca objek.
- c) Ratakan preparat hingga tipis, kemudian keringkan di udara.

- d) Fiksasi preparat dengan melewati kaca objek di atas api bunsen beberapa kali.
- e) Teteskan kristal violet dan diamkan selama ± 1 menit, kemudian bilas menggunakan aquadest.
- f) Teteskan larutan lugol dan diamkan selama ± 1 menit, lalu bilas kembali dengan aquadest.
- g) Teteskan alkohol 96% selama ± 10 – 20 detik sebagai peluntur, kemudian bilas dengan aquadest.
- h) Teteskan safranin selama ± 1 menit, lalu bilas dan keringkan preparat menggunakan tisu secara perlahan.
- i) Teteskan minyak imersi pada preparat, kemudian amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran $1000\times$.
- j) Catat hasil pengamatan berdasarkan bentuk dan warna bakteri. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah muda.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian diolah melalui beberapa tahap sebagai berikut

- a) Data hasil pengambilan sampel sedimen dicatat berdasarkan lokasi pengambilan (hulu, tengah, dan hilir).

- b) Pencatatan data awal, seluruh data hasil pengamatan di catat secara sistematis meliputi kode sampel, lokasi pengambilan sedimen, serta hasil isolasi bakteri pada masing masing sampel.
- c) Penghitungan jumlah koloni bakteri, koloni yang tumbuh di setiap cawan petri di hitung secara manual.
- d) Pengelompokan morfologi koloni, koloni bakteri di kelompokkan berdasarkan kesamaan ciri morfologi koloni.
- e) Penyajian data, data jumlah koloni dan morfologi koloni disajikan dalam bentuk tabel dan deskriptif naratif.
- f) Analisis data secara deskriptif, data dianalisis secara deskriptif dengan menjelaskan pola keberadaan bakteri indigenous berdasarkan jumlah koloni dan variasi morfologi koloni yang di temukan pada sedimen mangrove.
- g) Penarikan kesimpulan, kesimpulan di Tarik berdasarkan hasil analisis deskriptif untuk menggambarkan karakteristik bakteri indigenous.

2. Analisis data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara deskriptif. Data yang diperoleh dari hasil isolasi bakteri indigenous pada sedimen mangrove dianalisis dengan menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada setiap sampel dan mengelompokkan koloni berdasarkan karakteristik morfologi koloni, meliputi bentuk, warna, tepi, dan permukaan koloni. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel dan uraian naratif untuk menggambarkan keragaman bakteri indigenous yang ditemukan pada sedimen ekosistem mangrove.

G. Etika Penelitian

Penelitian ini mengedepankan prinsip-prinsip etika yang meliputi hak-hak individu yang menjadi subjek penelitian, dengan mengikuti pedoman-pedoman utama berikut:

1. *Respect for Person* (Menghormati Individu)

Peneliti menghormati martabat, otonomi, dan kebebasan individu, serta mengakui keragaman budaya subjek penelitian. Kerahasiaan informasi dijaga, dan persetujuan sukarela (*informed consent*) wajib diperoleh sebelum penelitian dimulai.

2. *Beneficence* (Berbuat Baik dan Tidak Merugikan)

Peneliti menjamin bahwa subjek penelitian tidak mengalami kerugian signifikan. Manfaat penelitian diupayakan lebih besar dari risikonya, dan risiko diminimalisir dengan teliti melalui tinjauan literatur dan desain penelitian yang aman.

3. *Justice* (Keadilan)

Semua subjek penelitian mendapatkan perlakuan adil dan setara tanpa diskriminasi. Risiko dan manfaat penelitian didistribusikan secara seimbang, dan perlakuan berdasarkan latar belakang dan kondisi subjek dilakukan secara etis.