

Deteksi Cemarkan Mikroorganismes pada Kawasan Konservasi Penyu di Pangumbahan Sukabumi

Dewi Elfidasari¹, Toufan Gifari² dan Irawan Sugoro³

^{1,2}Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Al Azhar Indonesia

³Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (PAIR-BATAN)

Penulis untuk Korespondensi/Email: d_elfidasari@uai.ac.id

Abstrak - Penyu hijau (*Chelonia mydas*) merupakan reptil ordo Testudines, famili Cheloniidae yang masuk dalam kategori terancam punah CITES Appendiks I. Populasi penyu hijau semakin menurun disebabkan berbagai macam faktor. Diduga mikroorganismes juga berperan dalam penurunan hasil penetasan. Oleh karena itu perlu dilakukan deteksi cemarkan mikroorganismes di kawasan konservasi penyu pangumbahan. Sampel mikroorganismes diambil dari habitat peneluran hingga pra dan pasca penetasan. Kemudian mikroorganismes diidentifikasi menggunakan metode molekuler dan *sequencing*. Hasil identifikasi menunjukkan mikroorganismes pencemar murni Gram negatif yang bersifat patogen. Golongan bakteri koliform yang terdeteksi adalah *E.coli*, *Salmonella* dan *Shigella*, sedangkan jamur didominasi oleh kapang dan *yeast*.

Kata Kunci: penyu hijau, *Chelonia mydas*, cemarkan mikroorganismes, konservasi penyu Pangumbahan.

Abstract - Green turtle (*Chelonia mydas*) is a reptile of Testudines, Cheloniidae family belonging to the endangered category of CITES Appendix I. The population of green turtles is declining due to various factors. Suspected microorganisms also play a role in decreasing hatchery results. Therefore it is necessary to detect microorganisms in the conservation area of turtle pangumbahan. Microorganism samples were taken from spawning habitat up to pre and post penetration. Then the microorganisms were identified using molecular method and sequencing. The identification results show that Gram negative pure microorganisms are pathogenic. Groups of coliform bacteria that are detected are *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*, while mushrooms are dominated by mold and yeast.

Keywords: Green Turtle, *Chelonia mydas*, microorganism pollution, Pangumbahan Turtle Conservation.

PENDAHULUAN

Sejak 1970 populasi penyu hijau terus mengalami penurunan walaupun proteksi sudah diberlakukan (Spotila 2004). Perburuan ilegal hingga upaya konservasi yang kurang maksimal belum mampu mengembalikan populasi penyu hijau seperti semula. Sejumlah penelitian membuktikan bahwa penurunan tingkat keberhasilan penetasan telur penyu disebabkan oleh interaksi bakteri dengan beberapa jenis telur penyu (Wyneken *et al.* 1988 ; Patino-Martinez *et al.* 2012).

Sebagai hewan yang memainkan peran penting dalam siklus detritus di laut, keberadaan penyu hijau perlu dijaga dan dilestarikan. Kawasan konservasi penyu pangumbahan merupakan area penangkaran yang fokus pada jenis penyu hijau. Kegiatan konservasi meliputi proses peneluran, penetasan telur dan pelepasan tukik. Penting sekali dilakukan analisis, identifikasi dan deteksi cemarkan mikroorganismes di kawasan konservasi pangumbahan, sehingga upaya konservasi dapat berjalan maksimal.

Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi jenis-jenis mikroorganisme pencemar kawasan konservasi penyu Pangumbahan terutama di daerah pantai, habitat peneluran dan penangkaran penyu hijau (*Chelonia mydas*) yang diduga menjadi penyebab rendahnya jumlah telur penyu yang menetas.

Penelitian ini akan memberikan hasil berupa data keberadaan cemaran mikroorganisme pada kawasan konservasi penyu Pangumbahan yang dapat menjadi sumber referensi bagi pemerintah daerah dan pemerintahan pusat dalam mengambil kebijakan terkait pengelolaan kawasan konservasi penyu Pangumbahan agar tidak terjadi penurunan populasi penyu akibat cemaran mikroorganisme di kawasan tersebut.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juli 2017. Pengambilan sampel dilakukan di UPTD Konservasi Penyu Pangumbahan, Sukabumi, Jawa Barat. Analisis keberadaan mikroorganisme pada tiap sampel dilakukan di Laboratorium Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN.

Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah sampel air laut, pasir di sarang alami, lendir kloaka induk pasca bertelur, pasir di sarang semi alami pra dan pasca penetasan, serta sampel telur segar dan telur yang gagal menetas dari kawasan konservasi penyu Pangumbahan.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah *cooling box*, *laminar air flow*, autoklaf, *vortex*, *thermalcycler (PCR)*, *centrifuge*, *thermostat*, *magnetic stirrer*, *water bath*, *microcentrifuge tube*, neraca analitik, mikroskop, inkubator, *sample tube*, *SV column*, erlenmeyer, *petri dish*, *beaker glass*, *pipette tips*, *micro pipette*, *L rod*, ose, sendok, tabung dan botol steril, pH meter, multimeter, bunsen, kulkas, kamera DSLR, *stopwatch*, tali, tisu, kapas, sarung tangan, masker, kertas label, *plastic wrap* serta aluminium foil.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain media *Nutrient agar (NA)*, media *Mac Conkey Agar (MCA)*, Media *Salmonella Shigella Agar (SSA)*, Media *Potato Dextrose Agar (PDA)* dan Media *E.Coli Agar (ECA)*, NaCl 0,85%, akuades, bahan pewarnaan bakteri gram, *absolute ethanol*, *buffer (BW, TW, AE, CL, BL)*, *Proteinase K Solution*, *PCR mix (aquades, CyberGreen, forward primer, reverse primer, DNA solution)*, alkohol 70%, serta *aquabidest pro injection*.

Tahap Penelitian dan Cara Kerja

Penelitian dibagi menjadi 2 tahapan, pertama tahap pengambilan sampel mikroorganisme dan kedua tahap analisis sampel mikroorganisme.

Tahap Pengambilan Sampel

Sampel dibagi menjadi 3 fase, fase 1 diambil dari proses peneluran yaitu sampel air laut yang diambil dari tiga lokasi pendaratan penyu dan diletakkan dalam *sample tube*. Selanjutnya sampel lendir kloaka dan telur segar diambil dari tiga induk penyu berbeda. Kemudian sampel pasir alami diambil dari tiga lokasi peneluran. Fase kedua meliputi sampel pasir semi alami di area penetasan (pra dan pasca penetasan). Fase terakhir adalah sampel telur busuk dan isi telur busuk pasca penetasan. Total sampel yang diperoleh adalah 8 jenis sampel dengan 3 pengulangan.

Tahap Analisis Sampel

Persiapan Sampel

Sampel yang diperoleh dari lokasi (pra dan pasca penetasan) dikemas dan dibawa menggunakan *cooling box*. Sampel cair (lendir kloaka dan air laut) diambil sebanyak 2 ml kemudian ditepatkan menggunakan NaCl 0,85% hingga 10 ml. kemudian untuk sampel padat (pasir) diambil dan ditimbang sebanyak 0,5 – 1 g dan ditepatkan menggunakan NaCl 0,85% hingga 5 ml. Persiapan yang dilakukan untuk sampel telur (telur segar dan gagal menetas) direndam dalam *beaker glass* berisi NaCl 0,85% dan ditepatkan hingga 100 ml. Selanjutnya untuk sampel isi telur yang gagal menetas disiapkan dengan cara cangkang digunting dan dikeluarkan isi telur (albumin dan yolk), kemudian dipepet sebanyak 1 ml dan ditepatkan menggunakan NaCl 0,85% hingga 10 ml. Setelah itu semua sampel dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril sebagai pengenceran 0.

Enumerasi Mikroorganisme

Seluruh sampel diambil sebanyak 100 µl kemudian dibuat 8 kali pengenceran didalam *microtube* berisi 0,9 ml NaCl 0,85%. Enumerasi mikroorganisme dari 19 jenis sampel dilakukan menggunakan metode *spread plate*. Enumerasi bakteri total dilakukan dengan mengambil 100 µl hasil pengenceran 0 hingga 8 dan *dispread* pada media NA. Jamur (kapang dan *yeast*) dienumerasi dengan mengambil 100 µl hasil pengenceran 0 hingga 8 dan *dispread* pada media SDA. Enumerasi *E. coli* dilakukan dengan *spread* hasil pengenceran 0 hingga 8 sebanyak 100 µl menggunakan media ECA. Media SSA digunakan untuk enumerasi *Salmonella Shigella* dengan mengambil 100 µl hasil pengenceran 0 dan *dispread*. Terakhir untuk koliform total dilakukan dengan mengambil 100 µl hasil pengenceran 0 hingga 2 dan *dispread* menggunakan MCA.

Perhitungan, Isolasi dan Pewarnaan Gram Bakteri

Perhitungan bakteri total, koliform total dan *E. coli*, dilakukan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Perhitungan *Salmonella Shigella* dan total jamur baru dilakukan setelah inkubasi selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan bentuk, warna dan ukuran tiap bakteri untuk kemudian diisolasi menggunakan metode gores. Hasil biakan murni yang didapat kemudian dibuat preparat dengan diratakan pada *object glass* dan dikeringkan. Setelah itu preparat diberikan 2-3 tetes larutan gram A dan dibiarkan 1 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan air mengalir dan dianginkan. Kemudian preparat diberikan 2-3 tetes larutan gram B dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Setelah dianginkan, preparat kembali diberi beberapa tetes larutan gram C hingga warna larutan sebelumnya luntur dan didiamkan beberapa menit. Terakhir preparat diberikan 2-3 tetes larutan gram D dan didiamkan selama dua menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya preparat diamati menggunakan mikroskop dan difoto.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi cemaran mikroorganisme di kawasan konservasi penyu Pangumbahan

Hasil analisa deteksi cemaran mikroorganisme di kawasan konservasi penyu Pangumbahan menunjukkan bahwa keberadaan mikroorganisme terdeteksi di seluruh sampel (Tabel 1). Sampel lendir kloaka, telur segar, telur busuk, telur isi, pasir tempat peletakan telur, pasir tempat penetasan telur (pra dan pasca penetasan) serta sampel air laut positif mengandung mikroorganisme

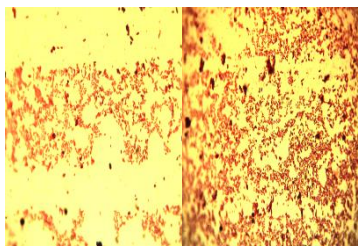
Tabel 1. Hasil deteksi keberadaan mikroorganisme di kawasan konservasi penyu Pangumbahan.

Sampel	Mikroorganisme
Lendir kloaka	positif
Telur segar	positif
Telur busuk	positif
Telur isi	positif
Pasir alami	positif
Pasir pra penetasan	positif
Pasir pasca penetasan	positif
Air laut	positif

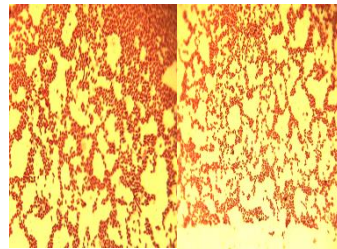
Berdasarkan pengamatan makroskopik ditemukan 6 koloni bakteri yang berbeda dari seluruh sampel. Secara morfologi, bentuk koloni yang terdeteksi adalah bundar didominasi oleh koloni berwarna putih, kemudian hijau dan biru. Koloni berwarna putih memiliki dua ukuran yakni besar dan kecil. Setelah dilakukan pewarnaan Gram, diperoleh hasil bahwa koloni tersebut telah murni Gram negatif dan bersifat patogen. Hasil uji gram terhadap setiap isolat berdasarkan pewarnaan gram menunjukkan bahwa semua isolat murni berasal dari gram negatif dan bersifat patogen. Bentuk sel semua isolat bakteri adalah basil dengan ukuran yang berbeda (Gambar 1).

Hasil identifikasi jamur pada media PDA dari keseluruhan sampel menunjukkan jamur berasal dari golongan *yeast* dan kapang. Pengamatan koloni khamir dilakukan setelah sampel diinkubasi selama 24 jam, sedangkan kapang baru dapat diamati setelah 72 jam. Secara makroskopis, kapang yang terdeteksi memiliki bentuk bulat berhifa dan berlendir.

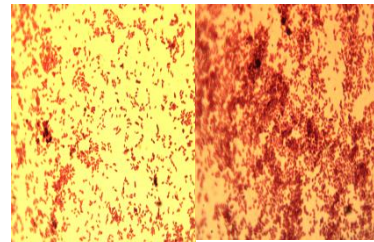
Sedangkan *yeast* memiliki ukuran yang lebih kecil dan berlendir (Gambar 1).



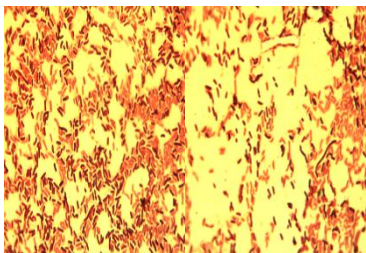
G. Isolat label 1



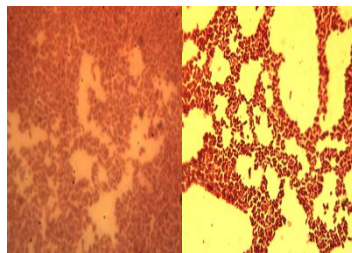
I. Isolat label 2



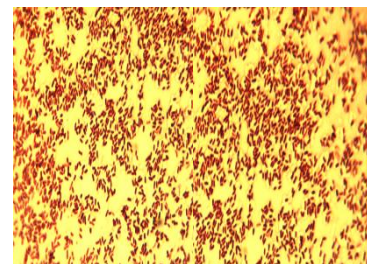
H. Isolat label 3



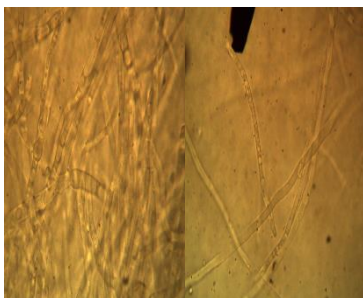
F. Isolat label 4



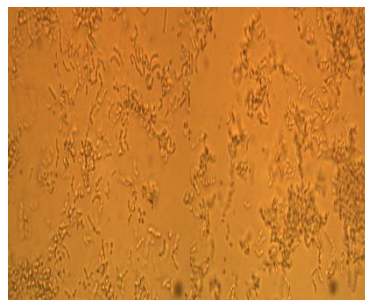
E. Isolat label 5



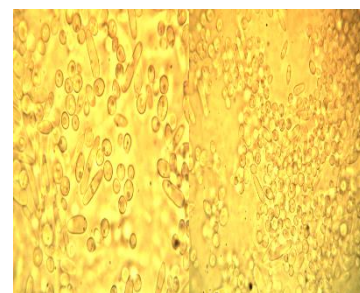
D. Isolat label 6



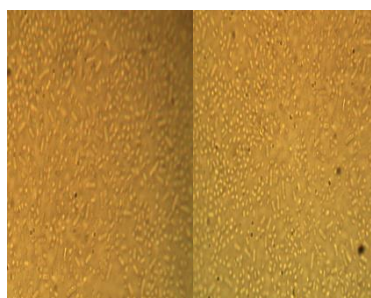
B. Kapang label T3



C. *Yeast* label 60



A. *Yeast* label T3



J. *Yeast* label T3a

Gambar 1. Hasil uji keberadaan mikroorganisme di kawasan konservasi penyus Pangumbahan.

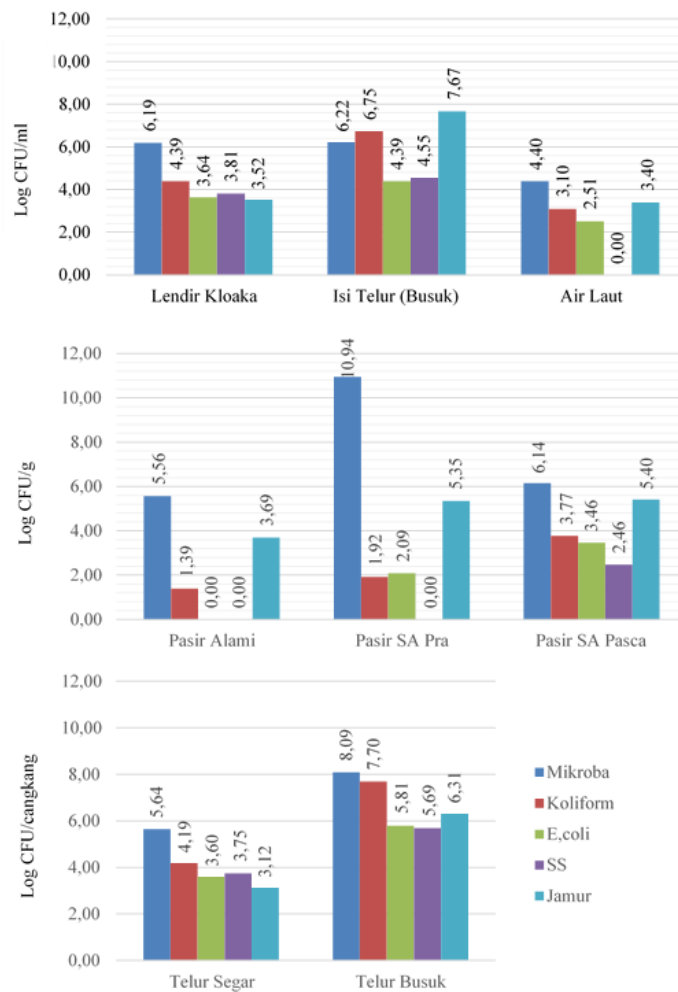
Jenis Mikroorganisme yang Dijumpai di Kawasan Konservasi Penyu Pangumbahan

Mikroorganisme yang berhasil dijumpai di kawasan konservasi penyu Pangumbahan meliputi bakteri koliform, *E.coli* dan *Salmonella Shigella*. Berdasarkan hasil kuantifikasi log CFU mikroorganisme, rata-rata enumerasi total mikroba, koliform, *E. coli*, dan jamur pada sampel fase (Lendir kloaka, air laut, telur segar dan pasir alami.) menunjukkan bahwa lendir kloaka memiliki tingkat cemaran tertinggi (Gambar 2). Lebih tingginya cemaran mikroorganisme pada lendir kloaka kemungkinan, disebabkan oleh kondisi pencernaan induk penyu. Alkindi *et al.* (2006) menyatakan bahwa kontaminasi mikroorganisme kemungkinan berasal dari sistem pencernaan induk penyu itu sendiri termasuk juga lubang kloaka. Karena pada dasarnya, lendir ini berupa cairan bening glikoprotein yang disekresikan dari kloaka, dan melapisi telur saat proses peneluran berlangsung (oviposis). Oleh karena itu, perpindahan mikroorganisme ke telur mungkin saja dapat terjadi melalui lendir kloaka akibat sistem reproduksi induk penyu yang sudah terinfeksi bakteri dan jamur terlebih dahulu (Keene 2012). Sehingga dapat diduga bahwa saluran reproduksi induk penyu telah terinfeksi.

Berdasarkan hasil kuantifikasi enumerasi mikroorganisme fase 1 (Gambar 2), jumlah mikroorganisme pada cangkang telur segar lebih sedikit dibandingkan dengan lendir kloaka. Kemungkinan lendir kloaka telah menghambat pergerakan koliform, jamur, *E. coli*, *Salmonella* dan *Shigella* untuk menginvasi telur. Pada penyu sisik, lendir kloaka yang disekresikan mengandung sifat antimikroba untuk melindungi telur dari mikroorganisme (Soslau *et al.* 2011; Phillott 2002). Percobaan yang dilakukan Ewert (1985) yaitu dengan mencuci lendir kloaka dari telur segar, dapat menyebabkan telur lebih mudah terinfeksi mikroba. Selanjutnya Phillott (2002) menemukan bahwa lendir kloaka juga dapat menghalangi pertumbuhan jamur selama beberapa hari. Jadi, jika lendir ini memiliki kemampuan untuk pertahanan terhadap jamur, mungkin terdapat kemampuan melawan pertumbuhan bakteri. Protein lain, seperti yang ditemukan di albumen telur, telah terbukti mampu memberikan pertahanan terhadap mikroorganisme (Phillott, 2002). Al-Bahry *et*

al. (2009) menemukan bahwa konsentrasi bakteri terendah ada pada albumen telur, dan menghubungkan pengamatan ini dengan sifat pertahanan kimia antimikroba protein albumen. Ada kemungkinan protein serupa dapat hadir dalam cairan kloaka, sehingga memiliki pertahanan yang sama untuk melindungi telur. Sifat antimikroba mungkin ada di lendir kloaka, karena sifat antimikroba relatif umum terjadi pada kondisi alami seperti pada tumbuhan, invertebrata, dan vertebrata. Namun, tidak diketahui apakah lendir tersebut mampu menahan telur melawan mikroorganisme setelah mengering, terutama pada akhir inkubasi saat embrio paling rentan terinfeksi (Phillott, 2002). Hal ini mungkin dapat menjadi dugaan awal ketika hasil enumerasi mikroorganisme dari sampel fase 3¹, yaitu sampel telur busuk pasca menetas memberikan hasil cemaran yang tinggi (Gambar 2). Terdeteksinya mikroorganisme pada isi telur pasca menetas dapat terjadi karena pori-pori pada lapisan cangkang menjadi lebih terbuka menjelang masa akhir inkubasi. Hal ini dapat menyebabkan mikroorganisme melakukan penetrasi dan berkoloni ke dalam komponen telur (Al-Bahry *et al.* 2004). Selain itu Berrang *et al.* (1996) menambahkan bahwa terdapat kemungkinan infeksi bakteri terhadap komponen telur sebelum cangkang terbentuk, karena indung telur dan uterus induk penyu yang sudah terlebih dahulu terinfeksi bakteri. Sedangkan pada pasir alami tidak terdeteksi keberadaan koloni *E. coli* maupun *Salmonella* dan *Shigella*. Keberadaan koloni *Salmonella Shigella* juga tidak terdeteksi pada sampel air laut, sehingga dapat dikatakan cemaran *Salmonella Shigella* berasal dari saluran pencernaan induk penyu yang terbawa oleh telur maupun lendir kloaka. Menurut Gantois *et al.* (2009), organ reproduksi induk penyu yang telah terinfeksi *Salmonella* dapat mengkontaminasi telur melalui filtrasi pada cangkang telur dan usus (kontaminasi feses) maupun kontaminasi langsung pada yolk, albumin dan cangkang sebelum oviposis berlangsung.

¹ Telur busuk dan isi telur busuk.



Gambar 2. Rata-rata enumerasi Log CFU mikroorganismen seluruh sampel

Hasil enumerasi sampel fase 2² yaitu pasir semi alami pasca menetas meliputi total mikroba, koliform, *E. coli*, *Salmonella Shigella* dan jamur terdeteksi diseluruh sampel (Gambar 2). Jumlah mikroorganismen pada pasir sarang semi alami pasca menetas mengalami peningkatan kecuali pada pertumbuhan jamur. Menurut Simbolon (2008), hal ini terjadi karena adanya persaingan diantara mikroorganismen itu sendiri, diduga jamur kalah bersaing dalam memanfaatkan nutrisi untuk dapat tumbuh dan berkembang. Keberadaan koloni *Salmonella Shigella* serta peningkatan jumlah koloni mikroba pada pasir semi alami pasca menetas disebabkan oleh proses penggalan dan penutupan sarang yang menyebabkan mikroorganismen terdispersi ke seluruh bagian

sarang. Selain itu mikroba juga dapat berasal dari induk penyu yang terbawa oleh telur. Keadaan ini bertambah buruk jika dalam satu sarang ada beberapa telur yang infertil atau fertil tetapi tidak mampu berkembang sempurna sehingga dapat memicu kolonisasi mikroorganismen dan mengancam perkembangan seluruh telur (Robinson *et al.* 2003). Selanjutnya, mikroorganismen memanfaatkan kalsium (CaCO₃) pada cangkang telur untuk tumbuh dan berkembang dengan cara memperkuat dinding sel serta membentuk ikatan protein – kalmodulin dan terbentuklah Ca – kalmodulin yang berfungsi dalam aktivasi enzim-enzim sitosol (Salisbury & Ross 1993).

Keberadaan koloni mikroorganismen pada sampel telur gagal menetas (busuk) baik isi maupun cangkang telur (Gambar 2)

² Pasir Semi Alami pra dan pasca

menunjukkan bahwa mikroorganisme telah berhasil melakukan penetrasi ke dalam telur melalui pori-pori cangkang. Limpus *et al.* (2008) menyatakan bahwa pori-pori pada permukaan cangkang telur berfungsi untuk pertukaran gas, uap air dan panas dari lingkungan eksternal. Akan tetapi, Al-Bahry *et al.* (2011) menambahkan bahwa selain penting dalam menunjang perkembangan embrio, pori-pori juga berpotensi menjadi jalur filtrasi mikroorganisme. Menurut Bilinski *et al.* (2001) seharusnya 43% kalsium pada cangkang telur digunakan untuk proses perkembangan embrio (osteogenesis). Akan tetapi, aktivitas jamur yang mengkonsumsi kalsium pada lapisan cangkang dapat menyebabkan proses pengikisan (Phillot *et al.* 2006). Selanjutnya, pengurangan kalsium pada cangkang akan sejalan dengan pertumbuhan hifa hingga menutup pori-pori cangkang yang berdampak pada penyumbatan pertukaran gas. Kemudian penetrasi hifa dilanjutkan hingga ke embrio yang menyebabkan kematian embrio (Phillot *et al.* 2006). Pada dasarnya, awal penetrasi mikroorganisme hingga dapat berkoloni pada komponen telur (yolk dan albumin) terjadi ketika struktur lapisan cangkang telah rusak (Al-Bahry *et al.* 2004).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Cemaran mikroorganisme terdeteksi hampir di seluruh sampel, Hasil identifikasi dan uji Gram menunjukkan jenis mikroorganisme yang terdeteksi adalah bakteri gram negatif (koliform), *E.coli*, *Salmonella* dan *Shigella*, sedangkan jamur didominasi kapang dan *yeast*.

Saran

Identifikasi mikroorganisme masih menunggu hasil uji molekuler (*Sequencing*) sehingga identifikasi bisa lebih dipertajam hingga ke spesies.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Al-Bahry SN, Mahmoud IY, Al-Harthi A, Elshafie AE, Al-Ghafri S, Alkindi AYA & Al-Amri I. 2004. Bacterial contamination in freshly laid egg green turtles *Chelonia mydas* at Ras Al Hadd reserve, Oman. In: 24 th International Symposium for Sea Turtles. San Jose, Costa Rica.
- [2] Al-Bahry SN, Mahmoud IY, Elshafie AE, Al-Hasby A, Al-Ghafari S, Al-Amri I & Al-Kindi AYA. 2009. Ultrastructure features and elemental distribution in eggshell during pre and post hatching periods in the green turtles *Chelonia mydas* at Ras Al-Hadd Oman. *Tiss cell*, vol. 42, no. 1, pp. 214-221.
- [3] Alkindi AYA, Mahmoud IY, Woller MJ, Plude JL. 2006. Oviductal morphology in relation to hormonal levels in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Tiss Cell* 38:19-33.
- [4] Berrang M, Frank JF, Buhr RJ, Bailey JS, Cox NA. 1996. Effect of hatching cabinet sanitation treatments on *Salmonella* cross-contamination and hatchability of broiler eggs. *Poul Scie* 75:191-196.
- [5] Bilinski JJ, Reina RD, Spotila JR, Paladino FV. 2001. The effects of nest environment on calcium mobilization by leatherback turtle embryos (*Dermochelys coriacea*) during development. *Com Biochem Phys Part A: Phys* 130:151-162.
- [6] Ewert M. 1985. *Embryology of turtles*. Dalam : Gans C, Billeu F, Maderson P. Ed.
- [7] *Biology of the Reptilia*. Vol. 14A. New York: John Wiley and Sons.
- [8] Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Immerseel FV. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol Rev* 33:4.
- [9] IUCN. 2015. *Chelonia mydas*. <http://www.iucnredlist.org/details/summary/4615/0> (Diakses pada 15 April 2016).
- [10] Keene. 2012. Microorganisms from Sand, Cloacal Fluid, and Eggs of *Lepidochelys olivacea* and Standard Testing of Cloacal Fluid Antimicrobial Properties. [tesis]. University of Indiana.
- [11] Limpus CJ, Kennett R, Whiting S. 2008. *A Biological Review of Australian Marine Turtle Species. 2. Green Turtle, Chelonia mydas (Linnaeus)*. Queensland: Environmental Protection Agency.
- [12] Patino-Martinez J, Marco A, Quinones L, Abella E, Abad R & Dieguez-

- Uribeondo J. 2012. Hoe do hatcheries influence embryonic development of sea turtle eggs? Experimental analysis and isolation of microorganisms in leatherback turtle eggs. *J. of Exp. Zool.* Vol. 317, no. 1, pp. 47-54.
- [13] Phillot AD. 2002. Fungal colonization of sea turtle nests in Eastern Australia. [disertasi]. Central Queensland University.
- [14] Phillot AD, Parmenter CJ, McKillup SC. 2006. Calcium depletion of eggshell after fungal invasion of sea turtle eggs. *Chelon Conserv Biol* 5:146-149.
- [15] Robinson J, Griffiths RA, Jeffries P. 2003. Susceptibility of frog (*Rana temporaria*) and toad (*Bufo bufo*) eggs to invasion by *Saprolegnia*. *Amphi Reptil* 24:261-268.
- [16] Salisbury FB, Ross CW. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Bandung: ITB. 132-135.
- [17] Simbolon Dennita. 2008. Penambahan mikroorganisme dan asam humik pada tanah latosol dan tanah *tailing* untuk meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman jagung (*Zea mays L.*). [Skripsi]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- [18] Soslau G, Russell JA, Spotila JR, Mathew AJ& Bagsiyao P. 2011.
- [19] *Acinetobacter* sp. HM 746599 isolated from leatherback turtle blood. FEMS Microbiology Letters. 322: 166-171.
- [20] Spotila JR. 2004. *Sea Turtles. A Complete Guide to Their Biology, Behavior, and Conservation*. Baltimore : John Hopkins University.
- [22] Wicaksono MA. 2014. Analisis mikroorganisme pada telur penyu hijau (*Chelonia mydas*) dari Taman pesisir pantai penyu pangumbahan Sukabumi. [Skripsi]. Jakarta : Universitas Al-Azhar Indonesia.
- [23] Wyneken J, Burke T & Pedersen D. 1988. Egg failure in natural and relocated sea turtle nest. *J. of Herpetology*. Vol. 22, no. 1, pp. 88-96.