

BAB III METODE PENELITIAN

1.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboraturium KaVe (Kampung Vanamei) Mandiri Dalegan, Panceng, Gresik. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2020 selama 21 hari.

1.2 Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat dan bahan yang di gunakan untuk pelaksanaan penelitian pada tabel 1. sebagai berikut :

Tabel 1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan Bahan	Fungsi
Isolat Bakteri dari Ikan Nila	Isolat Ikan Nila air tawar uji penelitian
Nutrient Borth (NB)	Untuk tempat tumbuh bakteri
Nutrient Agar (NA)	Media pertumbuhan bakteri
NaCl	Untuk pengenceran bakteri
Botol Gelap	Tempat menampung kultur
Tabung reaksi	Tempat pengenceran kultur dan tempat kultur isolate murni
Rak tabung reaksi	Tempat menyimpan tabung reaksi
Cawan Petri	Tempat media agar dan isolate bakteri
Mikropipet	Tempat mengambil cairan
Meja lamina flow	Tempat penanaman bakteri
Inkubator	Tempat penyimpanan bakteri/kultur bakteri
Autoklaf	Tempat untuk sterilisasi alat
pH meter	Alat ukur pH air dan suhu
Hand counter	Alat perhitungan koloni bakteri
Mikroskop	Alat melihat bakteri

1.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilaksanakan yaitu metode eksperimen. Menurut Zulnaidi (2007) bahwa, metode eksperimen merupakan prosedur yang dilakukan untuk mengungkapkan suatu hubungan sebab akibat dari dua variabel atau lebih dengan membawa pengaruh variabel lain. Cara ini dilaksanakan dengan memberi variabel bebas secara induce terhadap objek percobaan untuk diketahui akibatnya di dalam variabel.

1.3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini bersifat eksperimental kualitatif dan kuantitatif. Pada pengamatan morfologi koloni, sel dan pewarnaan gram dilakukan secara uji kualitatif digunakan untuk mendapatkan ukuran bakteri, warna koloni dari bakteri, bentuk koloni, dan tepian bakteri. Sedangkan pada saat uji pH dan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri dilakukan analisis kuantitatif untuk mendapatkan suhu dan pH optimum untuk perkembangan bakteri dan data jumlah total bakteri yang didapatkan. Hubungan antara Suhu terhadap perubahan pH tidak memiliki hubungan. Berdasarkan uji pengaruh antar variabel dalam SPSS, bahwa nilai SIG (*Significance*) antar suatu variabel dengan kata lain nilai SIG lebih tinggi, maka antar variabel tidak saling berpengaruh (Budiwati *et al.*, 2010) maka dilakukan Rancangan untuk percobaan pH dan suhu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu meletakkan desain percobaan secara acak agar seragam kecuali perlakuan pH dan suhu (Kusriningrum, 2008). Terdapat 12 perlakuan pH dan suhu yang dapat dilihat dalam Gambar 4.

D2	C3	B2	C1
C2	A3	D3	A1
B1	D1	A2	B3

A : pH 2

B : pH 4

C : pH 6

D : pH 8

B3	B2	A1	D3
A1	D3	B1	C2
D1	C2	D3	A2

A : suhu 25⁰C

B : suhu 27⁰C

C : suhu 29⁰C

D : suhu 31⁰C

Gambar 4. Layout Percobaan

Model linier

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$

A_i : Pengaruh perlakuan faktor A taraf ke-i

B_j : Pengaruh perlakuan faktor B taraf ke-j

$(AB)_{ij}$: pengaruh interaksi

e_{ijk} : pengaruh acak/galat percobaan

1.3.2 Variabel Penelitian

Tabel 2. Variabel Penelitian

Variabel bebas	Isolat bakteri
Variabel terkontrol	pH dan suhu perlakuan
Variabel terikat	Morfologi koloni, morfologi sel, warna gram, jumlah total bakteri (CFU/mL)

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Prosedur Pembuatan media pertumbuhan bakteri dan pengencer

a. Nutrien Agar (NA)

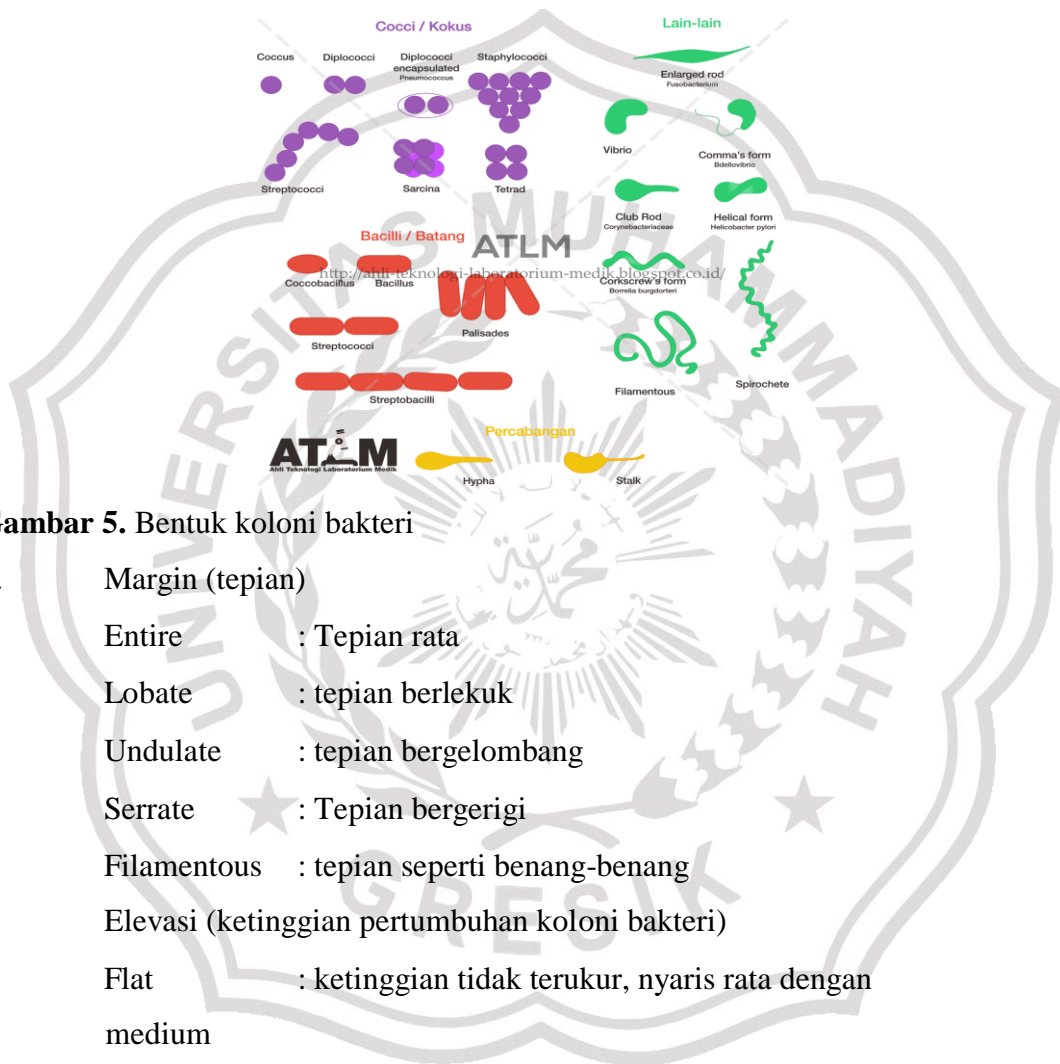
- Mempersiapkan alat dan bahan.
- Menimbang dan melarutkan 28 gr NA dalam 1000 ml akuades di Erlenmeyer.
- Mengaduk hingga homogen menggunakan magnetik stirrer dan hot plate.

- Menutup mulut erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil.
 - Mensterilkan media dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.
 - Mendinginkan media dan menuang ke dalam 36 cawan petri masing-masing 15 ml.
- b. Prosedur pembuatan media NB di botol gelap
- Dipersiapkan alat dan bahan.
 - Menimbang media NB yang dibutuhkan yaitu 14 g dan dilarutkan dalam 1000 mL akuades.
 - Mengaduk hingga homogen menggunakan magnetik stirrer dan hot plate.
 - Dimasukkan ke dalam botol gelap masing-masing berisi 50 ml sebanyak 8 botol.
 - Mensterilkan media dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.
 - Mendinginkan dan digunakan sebagai media kultur bakteri.
- a. Prosedur pembuatan Reagen NaCl Fis 0,9%.
- Siapkan alat dan bahan yang digunakan.
 - Menimbang NaCl sebanyak 4,5 gr dan dilarutkan dengan aquades
- Menggunakan rumus berikut :
- $$\text{Gr} = \text{kadar persen} \times \text{volume}$$
- $$\text{NaCl} = 0,9/100 \times 500 \text{ ml}$$
- $$\text{NaCl} = 0,009 \times 500 \text{ ml}$$
- $$\text{NaCl} = 4,5 \text{ gr}$$
- Kemudian taruh di gelas ukur dan tutup menggunakan aluminium foil dan beri label.

3.4.2 Karakterisasi morfologi koloni, sel dan pewarnaan gram

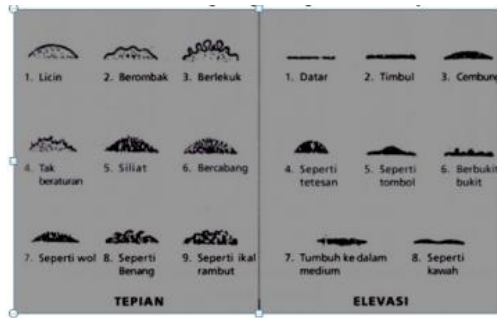
A. Morfologi koloni

- a. Ukuran, : bentuk titik, kecil, moderat atau sedang, besar.
- b. Pigmentasi (warna koloni) : putih, kuning, merah, ungu, dan lain-lain
- c. Form (Bentuk koloni)



Gambar 5. Bentuk koloni bakteri

- d. Margin (tepi)
 - Entire : Tepian rata
 - Lobate : tepi berlekuk
 - Undulate : tepi bergelombang
 - Serrate : Tepian bergerigi
 - Filamentous : tepi seperti benang-benang
- e. Elevasi (ketinggian pertumbuhan koloni bakteri)
 - Flat : ketinggian tidak terukur, nyaris rata dengan medium
 - Raised : ketinggian nyata terlihat, namun rata pada seluruh permukaan
 - Convex : bentuk cembung seperti tetesan air
 - Umbonate : bentuk cembung dibagian tengah lebih menonjol



Gambar 6. Tepian dan Elevasi

B. Pewarnaan Gram

- Obyek glass difiksasi/diaseptiskan
- Satu ose biakan kuman murni diletakkan di atas obyek glass, diratakan biakan kuman murni dengan alat liter L untuk meratakan bakteri.
- Difiksasi dengan cara melidahapikan bagian atas bunsen 2-3 kali dengan cepat
- Mengambil pewarna carbol violet, diamkan selama 1 menit, cuci preparat dengan air mengalir. Kemudian dikeringkan preparat dengan cara membiarkan di udara terbuka
- Lalu menuangkan pewarna iodium, biarkan selama 2 menit, dibuang sisa iodium lalu mencuci kaca preparat dengan air. Dikeringkan preparat diudara terbuka
- Proses selanjutnya dipucatkan dengan alkohol 95% dengan cara meneteskan perlahan sampai warna ungu hilang lalu dibilas dengan air mengalir
- Kemudian dituangkan pewarna safranin sebagai pewarna penutup atau pembeding biarkan selama 30 detik buang kelebihan safranin, cuci preparat dengan air mengalir, keringkan preparat
- Amati preparat dibawah mikroskop dengan perbesaran lemah (10 X) kemudian perbesaran kuat (100)

3.4.3 Penumbuhan bakteri pada pH dan suhu perlakuan

a. pH (2,4,6,8)

- 1) Sediakan tabung reaksi sesuai dengan jumlah pengenceran sebanyak 15 tabung. Masing-masing tabung diisi dengan medium atau aquades sebanyak 9 ml.
- 2) Membuat pengenceran sampel yang akan diperiksa mulai dari 10^{-1} hingga 10^{-6} . Caranya yaitu ambil 1 ml sampel awal ke dalam tabung reaksi pertama kemudian

kocok, maka konsentrasi tabung reaksi pertama adalah 10^{-1} . Selanjutnya lakukan proses tersebut hingga tabung ke-6.

- 3) Sediakan 36 botol gelap yang berisi medium bakteri (NB). Beri tanda sesuai dengan urutan pengenceran tabung reaksi.
 - 4) Ukur pH menggunakan kertas lakmus.
 - 5) Ambil hasil pengenceran kelima dari tabung pengenceran dan masukkan ke dalam botol gelap.
 - 6) Inkubasikan hasil kultur bakteri tersebut selama 24-48 jam di dalam oven.
 - 7) Tuangkan ke cawan petri untuk pertumbuhan dan perhitungan bakteri.
 - 8) Hitung hasil bakteri yang tumbuh pada setiap pengenceran. Jumlah bakteri yang ada dalam 1 ml sampel adalah berbanding terbalik dengan pengenceran. Sebagai contoh hasil dari pengenceran 10^{-6} terdapat 10 koloni, maka jumlah bakteri adalah 10×10^{-6} sel bakteri per 1 ml sampel.
- b. Suhu (25,27,29,31°C)
- 1) Ulangi perlakuan di atas dari nomer 1-2.
 - 2) Sediakan 36 cawan petri yang berisi medium (NA). beri tanda sesuai dengan pengenceran tabung reaksi.
 - 3) Ambil hasil pengenceran di tabung reaksi ke-5 dan tuang dalam cawan petri.
 - 4) Inkubasikan dana tur suhu sesuai perlakuan selama 24-48 jam.
 - 5) Hitung jumlah koloni yang tumbuh pada setiap pengenceran. Jumlah bakteri yang ada dalam 1 ml sampel adalah berbanding terbalik dengan pengenceran. Sebagai contoh hasil dari pengenceran 10^{-6} terdapat 10 koloni, maka jumlah bakteri adalah 10×10^{-6} sel bakteri per 1 ml sampel.
- c. Perhitungan bakteri

Pembentuk koloni Unit (CFU) adalah hasil perkiraan bakteri atau jamur angka. Tidak seperti menggunakan mikroskopis dimana semua bakteri mati dan hidup, dihitung, CFU memperkirakan sel layak. Munculnya koloni terlihat membutuhkan pertumbuhan yang signifikan dari sel awal berlapis. Pada saat menghitung mikroba tidak mungkin bisa untuk menentukan apakah koloni muncul dari satu sel atau 1.000 sel. Maka dari itu, hasilnya diberikan sebagai CFU / mL (unit pembentuk koloni per mililiter) untuk cairan, dan CFU / g (unit

pembentuk koloni per gram) untuk padatan untuk mencerminkan ketidakpastian ini (bukan sel / mL atau sel / g. (Wikipedia, 2012).

Pengamatan koloni dilakukan selama tahap 24 jam dan 48 jam. Hal ini karena pertumbuhan sudah mulai terlihat secara signifikan pada waktu 48 jam, kemungkinan pada waktu tersebut merupakan fase log dari pertumbuhan mikroba. Fase mikroba mengalami pembelahan sel atau fase adaptasi. Ketika pengamatan pada tahap 24 jam dilakukan, kemungkinan yang ada koloni masih berada pada fase lag, yaitu fase mikroba tidak mengalami pembelahan sel dan peningkatan aktivitas metabolisme (Tortora dkk. 2010).

3.4.4 Penghitungan jumlah total bakteri

Setelah 48 jam bakteri akan tumbuh dan bisa dihitung menggunakan Perhitungan sel langsung. Cara ini menggunakan HandCounter yang menjumlahkan hitungan total, karena semua sel terhitung, baik sel yang hidup maupun sel yang mati. Karena bakteri itu kecil, maka perhitungan yang dilakukan secara statistik diterima, namun harus dibuat pengenceran sekurang-kurangnya 10^6 .

3.5 Analisis Data

Hasil perhitungan data dianalisis menggunakan bantuan program Microsoft Excel 2010 untuk tabulasi data dan penyajian grafik. Untuk mengetahui pengaruh yang berbeda pada masing-masing perlakuan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) Two Way dan dengan menggunakan cara perhitungan dari program SPSS 16.0. Apabila diantara perlakuan berbeda nyata maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan's.