

III. METODE PENELITIAN

A. Uji Kontak Bakteri

A.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan pada Agustus 2011.

A.2. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, erlenmeyer, gelas beaker, spatula, jarum ose, tabung reaksi, rak tabung, *vortek mixer*, oven, kompor listrik, mikroskop, pembakar bunsen, timbangan, inkubator, gelas objek, *water bath*, *autoclave*, *micropipet*, *tip*, *water bath shaker* dan peralatan umum yang dipakai pada laboratorium.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah media pakan ayam, medium PCA (Plate Count Agar), medium Mac conkey, alkohol 70%, aquades,

kapas, aluminium foil, cat gram, ragi tapai, isolat *B.cereus*, *B.subtilis*, *B.Pseudomicoides*, *Paenibacillus polymixa* dan *Salmonella sp* (dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila).

A.3. Metode Penelitian

Penelitian kontak bakteri ini menggunakan metode modifikasi kultur bersama dari Vaseeharan dan Ramasamy (2003 : 84) pada media PCA (Plate Count Agar) dan Mac conkey. Pada metode modifikasi kultur bersama, bakteri yang akan diuji dicampurkan pada satu media atau tempat yang sama. Sehingga dari percampuran tersebut akan menimbulkan interaksi yang berdampak pada populasi bakteri yang diuji. Penentuan pertumbuhan bakteri *Bacillus sp*, ragi tapai dan bakteri *Salmonella* menggunakan prinsip hitungan cawan pada media PCA (Fardiaz, 1993 :43). Variabel yang diamati adalah jumlah total pertumbuhan mikroba.

A.4. Cara Kerja Penelitian

1. Penyiapan Inokulum Bakteri

Penyiapan inokulum bakteri dengan cara menumbuhkan 4 isolat bakteri *Bacillus* (*B.cereus*, *B.subtilis*, *B.Pseudomicoides*, *Paenibacillus polymixa*) dari hasil penelitian terdahulu (Sumardi, 2008) secara terpisah pada media Nutrien Agar dan bakteri *Salmonella* pada media Mac conkey , kemudian di inkubasi pada suhu 40⁰C dan 37⁰C selama 24 jam.

2. Penyiapan Starter Bakteri

Kultur bakteri *Bacillus*, mikroba ragi tapai, dan *Salmonella* yang berumur 24 jam, masing-masing di ambil sebanyak satu ose dan di masukkan kedalam erlenmeyer 250 ml yang berisi NB (Nutrient Broth), kemudian di inkubasi pada suhu 40°C selama 12 jam di dalam *water bath shaker*.

3. Penghitungan Sel Bakteri

Perhitungan bakteri di lakukan secara langsung di bawah mikroskop dengan cara sebagai berikut :

- a. 1 ml starter diambil kemudian di tambahkan kedalam 9 ml aquades dan dihomogenkan dengan vortek selama 1-2 menit.
- b. 1 ml suspensi dipindahkan dengan pipet steril kedalam 9 ml aquades sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} .
- c. Dari pengenceran 10^{-2} di ambil 0,01 ml suspensi bakteri, kemudian di letakkan diatas gelas objek yang berukuran 1 cm x 1cm dan dilakukan pengecatan gram.
- d. Perhitungan sel bakteri menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Konsentrasi sel : } \frac{x}{\text{Luas lapang pandang mikroskop (cm}^2\text{)}} \times t \text{ (cm)}$$

Keterangan : x = rata-rata jumlah bakteri
t = tinggi

4. Uji Kontak Bakteri

Pada uji kontak bakteri dilakukan dengan metode modifikasi kultur bersama dari Vaseeharan dan Ramasamy (2003 : 84). Bakteri *Bacillus sp*, *ragi tapai* dan bakteri *Salmonella* berumur 12 jam yang telah dihitung dimasukkan kedalam 50 ml media pakan ayam, dengan beberapa perlakuan.

Perlakuan 1 : Bakteri *Bacillus* berumur 12 jam yang telah dihitung dimasukkan kedalam 50 ml media pakan ayam kemudian diinkubasi didalam water bath shaker sebagai kontrol.

Perlakuan 2 : Ragi tapai berumur 12 jam yang telah dihitung mikrobanya, dimasukkan kedalam 50 ml media pakan ayam kemudian diinkubasi didalam water bath shaker sebagai kontrol.

Perlakuan 3 : Campuran *Bacillus* dan ragi tapai berumur 12 jam yang telah dihitung dimasukkan kedalam 50 ml media pakan ayam kemudian diinkubasi didalam water bath shaker sebagai kontrol.

Perlakuan 4 : Campuran *Bacillus*, ragi tapai dan *Salmonella* berumur 12 jam yang telah dihitung dimasukkan kedalam 50 ml media pakan ayam kemudian diinkubasi didalam water bath shaker sebagai uji kontak bakteri

Perlakuan 5 : Bakteri *Salmonella* berumur 12 jam yang telah dihitung dimasukkan kedalam 50 ml media pakan ayam kemudian diinkubasi didalam water bath shaker sebagai sebagai kontrol.

5. Penentuan Pertumbuhan Total Mikroba

Penentuan pertumbuhan total mikroba di lakukan dengan menghitung jumlah koloni bakteri dengan metode hitungan cawan yaitu dengan cara :

- a. Biakan bakteri yang berumur 24 jam pada media pakan ayam diambil sebanyak 100 μ l, kemudian ditambahkan ke dalam 900 μ l aquades dan dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 1-2 menit.
- b. Sebanyak 100 μ l suspensi dipindahkan dengan pipet steril kedalam 900 μ l aquades sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} , kemudian 100 μ l suspensi dari pengenceran 10^{-2} dimasukkan ke dalam 900 μ l aquades sampai pengenceran 10^{-6} dengan cara yang sama.
- c. Sebanyak 100 μ l suspensi bakteri dari seri pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} masing-masing dituang ke dalam cawan petri steril secara pour plate, kemudian ditambahkan media PCA untuk campuran bakteri *Bacillus sp*, ragi tapai dan *Salmonella*, kontrol bakteri ragi tapai, kontrol bakteri *Bacillus sp*, kontrol bakteri *Bacillus sp* dan ragi tapai, serta media Mac conkey Agar untuk campuran bakteri *Bacillus*

sp, ragi tapai dan *Salmonella* serta kontrol bakteri

Salmonella.

- d. Setelah media padat lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 40°C.
- e. Koloni yang tumbuh diamati dan dihitung jumlah koloninya, tahapan kerja ini dilakukan sampai empat hari. Penentuan pertumbuhan total mikroba dihitung dengan prinsip hitungan cawan pada media PCA. Cara kerja ini dilakukan untuk mengetahui total mikroba yang tumbuh serta berapa lama daya tahan hidup bakteri *Salmonella* akibat adanya pengaruh kontak bakteri *Bacillus* dan mikroba ragi tapai.

B. Pengumpulan Data dan Analisis Data

Pengumpulan data dan analisis data yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. Pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan menghitung jumlah total mikroba yang tumbuh pada media PCA (Plate Count Agar) dan Mac. Conkey pada ke-5 perlakuan yaitu kontrol *Bacillus*, kontrol ragi tapai, campuran *Bacillus* dan ragi tapai, campuran *Bacillus*, ragi tapai dan *Salmonella*, serta kontrol *Salmonella*. kemudian data dimasukkan ke dalam tabel hasil perhitungan total mikroba.

1. Tabel jumlah total bakteri kontrol *Bacillus*.

Inkubasi hari ke.....	Jumlah total mikroba			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1				
2				
3				
4				

2. Tabel jumlah total mikroba kontrol mikroba ragi tapai

Inkubasi hari ke.....	Jumlah total mikroba			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1				
2				
3				
4				

3. Tabel jumlah total mikroba campuran *Bacillus* dan mikroba ragi tapai

Inkubasi hari ke.....	Jumlah total mikroba			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1				
2				
3				
4				

4. Tabel jumlah total mikroba campuran *Bacillus*, mikroba ragi tapai dan *Salmonella*

Inkubasi hari ke.....	Media PCA				Media Mac. conkey			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1								
2								
3								
4								

5. Tabel jumlah total bakteri kontrol *Salmonella*

Inkubasi hari ke.....	Jumlah total mikroba			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1				
2				
3				
4				

2. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan transformasi logaritma. Digunakan transformasi logaritma karena angka yang diperoleh pada jumlah total mikroba terlalu besar atau mempunyai kisaran sangat luas. Transformasi ini tidak dapat digunakan secara langsung pada nilai nol, dan bila beberapa nilai pengamatan kurang dari 10, maka diinginkan mendapat transformasi yang berfungsi seperti akar untuk nilai-nilai yang kecil dan seperti logaritma untuk nilai-nilai yang besar. Penambahan 1 pada setiap pengamatan sebelum diambil logaritmanya mempunyai pengaruh atau akibat seperti yang diinginkan ini. Jadi $\log(Y+1)$ berlaku seperti transformasi akar untuk bilangan-bilangan sampai 10, tetapi tidak berbeda jauh dengan $\log Y$ untuk bilangan-bilangan selanjutnya. Setelah angka transformasi log diperoleh kemudian dibuat grafik transformasi log terhadap waktu untuk mengetahui pola pertumbuhan mikroba dan daya tahan bakteri *Salmonella* akibat adanya pengaruh kontak bakteri *Bacillus* dan ragi tapai.

C. Cara Kerja Karakterisasi Mikroba Ragi Tapai

Karakterisasi mikroba dari ragi tapai terdiri dari isolasi mikroba ragi tapai, uji morfologi dari isolat yang diperoleh dari isolasi, uji enzim dari isolat yang diperoleh dari isolasi, dan uji fisiologi dari isolat yang diperoleh dari isolasi.

1. Isolasi mikroba ragi tapai

- a. Ragi tapai seberat 0,02 gram masing-masing dimasukkan ke dalam 3 media cair yang berbeda, yaitu media PDB (Potato Dextrose Borth)

ditambah pati 1%, media NB (Nutrient Broth) ditambah pati 1% dan media pakan ayam ditambah pati 1%, masing-masing sebanyak 50 ml pada setiap erlenmeyer. Ragi yang ditumbuhkan pada media PDB (Potato Dextrose Borth) sebanyak dua erlenmeyer dan diberi label A dan B. Sedangkan ragi yang ditumbuhkan pada media NB (Nutrient Broth) juga sebanyak satu erlenmeyer dan diberi label C dan ragi yang ditumbuhkan pada media pakan ayam sebanyak satu erlenmeyer dan diberi label D.

- b. Ketiga Erlenmeyer yang berlabel A, B dan C diinkubasi selama 24 jam di Shacer Waterbath, sedangkan Erlenmeyer D diinkubasi selama 48 jam.
- c. Setelah 24 jam, dari erlenmeyer A diambil sebanyak 1 ml dan ditumbuhkan pada media YMEA (Yeast Mold Extract Agar) + pati 1% pada tiga cawan petri diberi label A₁, A₂, A₃, dari erlenmeyer B diambil sebanyak 1 ml dan ditumbuhkan pada media PDA (Potato Dextrose Agar) + pati 1% pada tiga cawan petri diberi label B₁, B₂, B₃, dari erlenmeyer C diambil sebanyak 1 ml dan ditumbuhkan pada media NA (Nutrient Agar) + pati 1% pada tiga cawan petri diberi label C₁, C₂, C₃, dan pada erlenmeyer D setelah diinkubasi selama 48 jam diambil sebanyak 1 ml dan ditumbuhkan pada media NA (Nutrient Agar) + CMC 1% pada tiga cawan petri diberi label D₁, D₂, D₃.
- d. Isolat A₁, A₂, A₃ dan B₁, B₂, B₃ diinkubasi selama 48 jam di inkubator kapang. Sedangkan C₁, C₂, C₃ dan D₁, D₂, D₃ diinkubasi selama 24 jam pada inkubator bakteri.

e. Setelah isolat tumbuh pada cawan petri A₁, A₂, A₃, B₁, B₂, B₃, C₁, C₂, C₃ dan D₁, D₂, D₃ kemudian dibuat replica plating. Replica plating merupakan metode untuk menggandakan isolat dengan cara memberi nomor pada isolat yang akan digandakan pada masing-masing cawan petri dan dari nomor satu isolat tersebut akan digandakan menjadi 2 pada 2 cawan petri. Sehingga isolat dari 12 cawan petri yang diperoleh dari isolasi akan menghasilkan 36 replica plating.

2. Uji morfologi dari isolat yang diperoleh dari isolasi

Dari isolat yang tumbuh dari hasil isolasi akan diuji morfologi dengan cara dilihat bentuk koloni, warna koloni dan dilakukan pengecatan. Pada isolat A₁, A₂, A₃ dilakukan pengecatan sederhana sedangkan pada isolat B₁, B₂, B₃, C₁, C₂, C₃ dan D₁, D₂, D₃ dilakukan pengecatan gram.

3. Uji enzim dari isolat yang diperoleh dari isolasi

Dari hasil 36 replica plating isolat yang diperoleh dari isolasi maka diambil 1 replica untuk diuji enzimatisnya. Uji enzim ini dilakukan dengan cara ditetaskan I₂KI (iodine) pada replica isolat A₁, B₁ dan C₁, jika terdapat zona jernih disekitar koloni isolat A₁, B₁ dan C₁ maka isolat ini menghasilkan enzim amilase . Sedangkan pada 1 replica isolat D₁ ditetesi dengan congo red. Jika disekitar koloni isolat D₁ terdapat zona jernih maka isolat ini menghasilkan enzim selulase.

4. Uji fisiologi dari isolat yang diperoleh dari isolasi

Dari isolat yang diperoleh kemudian di uji fisiologinya, uji fisiologi meliputi uji biokimia.

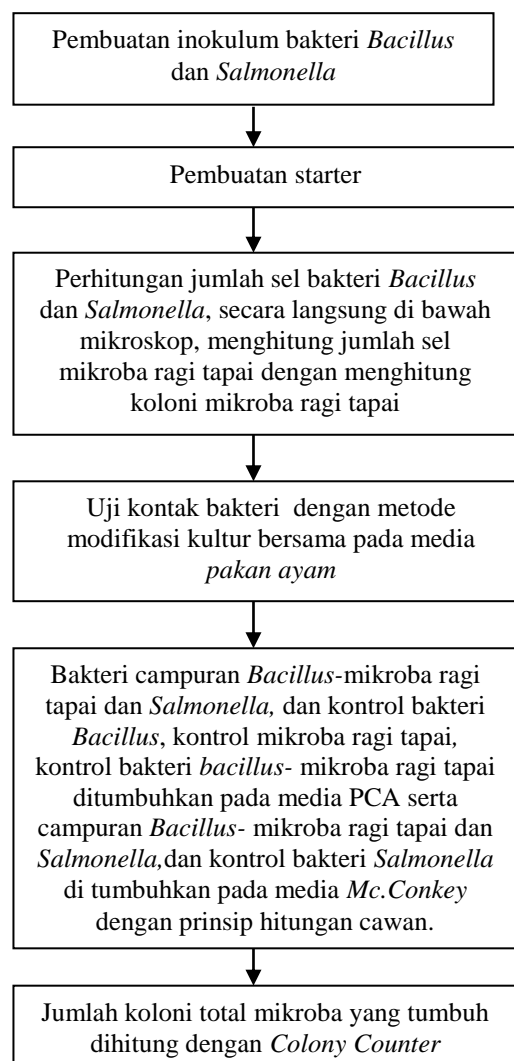
Uji biokimia dilakukan dengan cara :

- a. Dari isolat A₁, B₁ dan C₁ diambil 1 ose kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing 9 ml aquades steril dan diberi label AA₁, BB₂, dan CC₁ kemudian dihomogenkan menggunakan vortex mixer.
- b. Dari tabung AA₁ diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml media Laktosa Broth yang telah berisi tabung durham, digunakan tiga tabung reaksi yang berbeda untuk media Laktosa Broth dan masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1 ml dari tabung AA₁.
- c. Tiga tabung reaksi yang berisi media Laktosa Broth dan isolat dari tabung AA₁ diberi label ALB₁, ALB₂, dan ALB₃. Kemudian dilakukan langkah yang sama seperti yang dilakukan untuk media Laktosa Broth tetapi diinokulasikan pada media Glukosa Broth dan media Sukrosa Broth.
- d. Pada media Glukosa Broth diberi label AGB₁, AGB₂, dan AGB₃ sedangkan pada media Sukrosa Broth diberi label ASB₁, ASB₂, dan ASB₃. Masing-masing media ini terdiri dari tiga tabung reaksi untuk memperkuat uji biokimia. Untuk isolat B₁, C₁, dan D₁ juga dilakukan uji biokimia seperti langkah diatas menggunakan media yang sama yaitu Laktosa Broth, Glukosa Broth dan Sukrosa Broth.
- e. Setelah dilakukan prosedur uji biokimia seperti pada isolat A₁ kemudian pada isolat B₁, C₁ dan D₁ setelah diinokulasikan ke media Laktosa Broth (LB), Glukosa Broth (GB) dan Sukrosa Broth (SB) diberi label BLB₁, BLB₂, BLB₃, BGB₁, BGB₂, BGB₃, BSB₁, BSB₂, BSB₃, CLB₁,

CLB₂, CLB₃, CGB₁, CGB₂, CGB₃, CSB₁, CSB₂, CSB₃, DLB₁, DLB₂,
DLB₃, DGB₁, DGB₂, DGB₃, DSB₁, DSB₂, dan DSB₃

- f. Kemudian 36 tabung yang sudah diberi label diinkubasi pada inkubator bakteri selama 24 jam.
- g. Diamati perubahan warna pada media, terbentuknya gelembung pada tabung durham dan timbulnya endapan pada dasar tabung reaksi.

D. Diagram Alur Penelitian



Gambar 1. Diagram Alur Penelitian

B. Aplikasi Bahan Ajar di SMA

A. Waktu dan Tempat

Aplikasi Penelitian telah dilakukan di SMA Negeri 5 Bandar Lampung, SMA Negeri 12 Bandar Lampung dan SMA PERSADA Bandar Lampung pada Agustus dan September 2011.

B. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh siswa SMA Negeri dan swasta di Bandar Lampung. Sampel penelitian adalah siswa SMA Negeri 5 Bandar Lampung yang memiliki akreditasi A, SMA Negeri 12 Bandar Lampung yang memiliki akreditasi B, dan SMA PERSADA Bandar Lampung yang memiliki akreditasi C.

C. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain deskriptif sederhana, desain hanya bermaksud untuk membuat pencandraan (deskripsi) mengenai situasi dalam kejadian-kejadian yang diamati.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode survei. Dalam Koestoro dan Basrowi (2006 : 99) metode survei adalah suatu metode penelitian yang dilakukan sekumpulan objek yang cukup banyak dalam suatu jangka waktu tertentu.

D. Prosedur Penelitian

Langkah-Langkah Penelitian :

1. Pra Penelitian

- a. Seluruh sekolah di Bandar Lampung didata berdasarkan tingkat akreditasi.
- b. Sampel penelitian ditentukan.
- c. Dibuat surat izin penelitian ke sekolah tempat diadakannya penelitian
- d. Diadakan observasi ke sekolah-sekolah yang menjadi sampel penelitian.
- e. Instrumen penelitian dibuat oleh peneliti, instrumen penelitian yang dibuat yaitu :
 1. Bahan ajar materi Kompetisi Bakteri.
Bahan ajar dibuat dengan mengumpulkan sumber-sumber materi terlebih dahulu dari jurnal penelitian dan buku kemudian disusun dalam bentuk bahan ajar.
 2. Lembar angket tanggapan siswa dan guru mengenai kualitas bahan ajar.
Lembar angket tanggapan siswa dan guru mengenai kualitas bahan ajar terdiri dari 15 pertanyaan dengan pilihan jawaban : ”ya” dan ”tidak”.
- f. Diadakan uji validitas instrumen dengan menggunakan uji ahli.

2. Pelaksanaan Penelitian

Dilaksanakan penelitian dengan mengaplikasikan bahan ajar materi Kompetisi Bakteri ke SMA Negeri 5 Bandar Lampung, SMA Negeri 12 Bandar Lampung dan SMA PERSADA Bandar Lampung. Penelitian ini dirancang sebanyak satu kali pertemuan. Bahan ajar diberikan pada saat pembelajaran berlangsung.

D. Jenis Data dan Teknik Pengambilan Data

Jenis dan teknik pengambilan data pada penelitian ini adalah :

1. Jenis Data

Data kuantitatif adalah data yang diperoleh dari lembar angket tanggapan siswa dan guru.

2. Teknik Pengambilan Data

Data penelitian ini diperoleh dengan teknik pengumpulan data dari lembar angket tanggapan siswa dan guru mengenai kualitas bahan ajar. Angket tanggapan siswa dan guru diberikan setelah pembelajaran selesai.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh dari angket tanggapan siswa dan guru yang berupa data kuantitatif yang kemudian diubah menjadi data kualitatif. Adapun

rumus yang digunakan dalam menganalisis angket tanggapan siswa dan guru adalah sebagai berikut:

a) Untuk analisis deskriptif persentase adalah :

$$\% = \frac{n}{N} \times 100$$

Keterangan :

n = Nilai yang diperoleh responden

N = Nilai yang semestinya diperoleh responden

% = Persentase angket tanggapan siswa dan guru kelas X SMA terhadap kualitas bahan ajar.

b) Data penelitian dianalisis dengan menggunakan analisis persentase.

Hasil perhitungan dalam bentuk persentase diinterpretasikan dengan tabel kriteria angket tanggapan siswa dan guru mengenai kualitas bahan ajar kemudian ditafsirkan dengan kalimat yang bersifat kualitatif. Untuk mengetahui kriteria hasil perhitungan dilihat berdasarkan tabel.

Tabel 3. Kriteria tanggapan siswa dan guru mengenai kualitas bahan ajar

No	Interval	Pernyataan
1	$\geq 76\% - \leq 100\%$	Sebagian besar siswa/guru menyatakan kualitas komponen bahan ajar baik
2	$\geq 51\% - \leq 75\%$	Sebagian siswa/guru menyatakan kualitas komponen bahan ajar baik
3	$\geq 25\% - \leq 50\%$	Sebagian kecil siswa/guru menyatakan kualitas komponen bahan ajar baik