

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNILA. Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2011. Hasil penelitian di aplikasikan di tiga SMA yaitu SMA Negeri 5 Bandar Lampung, SMA Negeri 12 Bandar Lampung, dan SMA PERSADA Bandar Lampung.

B. 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, kapas, microtube, aluminium foil dan peralatan umum yang dipakai pada laboratorium.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah medium NA, medium MC Conkey, Plate count agar (PCA), pakan ayam, alkohol 70%, aquades, , pakan ayam komersial, cat gram, isolat *B.cereus*, *B.subtilis*, *B.Pseudomicoides*,

Paenibacillus polymixa, dan *Escherichia coli* (dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila).

C. Rancangan Penelitian

Penelitian kontak bakteri ini menggunakan metode modifikasi kultur bersama dari Vaseeharan dan Ramasamy (2003 : 84) pada media PCA (Plate Count Agar) dan Mc. Conkey. Penentuan pertumbuhan bakteri *Bacillus*, ragi tapai dan bakteri *E.coli* menggunakan prinsip hitungan cawan pada media PCA (Ferdiaz, 1993 :43). Variabel yang diamati adalah jumlah total pertumbuhan mikroba.

D. Cara Kerja Penelitian

1. Penyiapan Inokulum Bakteri

Penyiapan inokulum bakteri dengan cara menumbuhkan 6 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 *E.coli* pada media *Eosin Methylen Blue* Agar, kemudian di inkubasi pada suhu 40⁰C dan 37⁰C selama 24 jam.

2. Penyiapan Starter Bakteri

Kultur bakteri *Bacillus* dan bakteri *E.coli* yang berumur 24 jam, di ambil sebanyak satu ose dan di masukkan kedalam tabung reaksi yang berisi Nutrien Broth, kemudian di inkubasi pada suhu 40⁰C selama 12 jam di dalam *water bath shaker*.

3. Perhitungan Sel Bakteri

Perhitungan bakteri dilakukan 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:

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

Keterangan : X = rata-rata jumlah bakteri

t = tinggi

4. Uji Kontak Bakteri

Pada uji kontak bakteri dilakukan dengan metode modifikasi kultur bersama dari Vaseharan dan Ramasamy (2003 : 84). Metode yang mana bakteri *Bacillus*, mikroba ragi tapai dan *E.coli* ditumbuhkan pada satu media yakni pada penelitian ini digunakan Media Pakan Ayam. Bakteri *Bacillus* dan bakteri *E.coli* berumur 12 jam yang telah dihitung dimasukkan bersama-sama kedalam 50 ml media Pakan ayam sebagai control, sehingga konsentrasinya sel masing-masing, bakteri *Bacillus* sebesar

10^6 sel/ml dan bakteri *E.coli* 10^5 sel/ml (perbandingan 1:10 untuk kultur bersama). Biakan diinkubasi selama 96 jam didalam *water bath shaker*.

Setiap 24 jam dilakukan penentuan pertumbuhan bakteri. masing-masing perlakuan sebagai berikut:

Perlakuan 1 : Bakteri *Bacillus sp. B.cereus, B.subtilis,*

B.Pseudomicoides, Paenibacillus polymixa) yang berumur 12 jam yang telah dihitung dimasukkan pada 50 ml media Pakan ayam kemudian diinkubasi didalam *water bath shaker* sebagai kontrol.

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

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

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

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

5. Penentuan Pertumbuhan Bakteri

Penentuan pertumbuhan bakteri 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 1 ml suspensi bakteri dari seri pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , masing-masing di tuang ke dalam cawan petri steril secara *pour plate*, kemudian ditambahkan media pakan ayam untuk campuran bakteri *Bacillus sp* dan *E.coli*, dan control bakteri *Bacillus sp*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp + Escherichia coli*, ragi tape serta media *Mc. Conkey Agar* untuk bakteri *E.coli* dan control bakteri *E.coli* sebanyak 15 ml.

- 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 karena empat hari adalah usia produktif bakteri melakukan pertumbuhannya (winarni:2010). Penentuan pertumbuhan total mikroba dihitung dengan prinsip hitungan cawan pada media PCA (*Plate Count Agar*).

E. Pengumpulan Data dan Analisis Data

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 sp.*, kontrol ragi tapai, campuran *Bacillus sp.* dan ragi tapai, campuran *Bacillus sp.*, ragi tapai dan *E.coli*, serta kontrol *E. coli* kemudian data dimasukkan ke dalam tabel hasil perhitungan total mikroba. Tabel 1. Perhitungan data sebagai berikut:

I. Tabel jumlah total bakteri *Bacillus sp.*

Inkubasi hari ke.....	Jumlah total mikroba			
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1				
2				
3				
4				

2. Tabel jumlah total 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 sp.* dan 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 sp.*, ragi tapai dan *E.coli.*

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 *E. coli*

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 log.

Digunakan transformasi log karena angka yang diperoleh pada jumlah total mikroba terlalu besar. Setelah angka transformasi log diperoleh

kemudian dibuat grafik transformasi log terhadap waktu untuk mengetahui pola pertumbuhan mikroba dan daya tahan bakteri *E. coli* akibat adanya pengaruh kontak bakteri *Bacillus* dan ragi tapai

F. 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.

Untuk mengisolasi mikroba dalam ragi tapai digunakan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Isolasi mikroba ragi tapai

- a. Ragi tapai seberat 0,02 gram dimasukkan ke dalam 2 media cair yang berbeda, yaitu media PDB (Potato Dextrose Borth) ditambah pati 1% dan media NB (Nutrient Broth) 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 dua erlenmeyer dan diberi label C dan D.
- b. Keempat erlenmeyer kemudian diinkubasi selama 24 jam di Shacer Waterbath.
- 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 dari erlenmeyer D diambil sebanyak 1 ml dan ditumbuhkan pada media NA (Nutrient Agar) + CMC 1% pada tiga cawan petri diberi label D₁, D₂, D₃.

- d. 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 meneteskan I₂KI (iodine) pada replica isolat A₁, B₁ dan C₁. Sedangkan pada 1 replica isolat D₁ ditetesi dengan congo red. Jika disekitar koloni isolat A₁, B₁ dan C₁ terdapat zona jernih maka isolat ini menghasilkan enzim amilase. Sedangkan jika disekitar koloni isolat D₁ terdapat zona jernih maka isolat ini menghasilkan enzim selulase.

4. Uji fisiologi dari isolat yang diperoleh dari isolasi

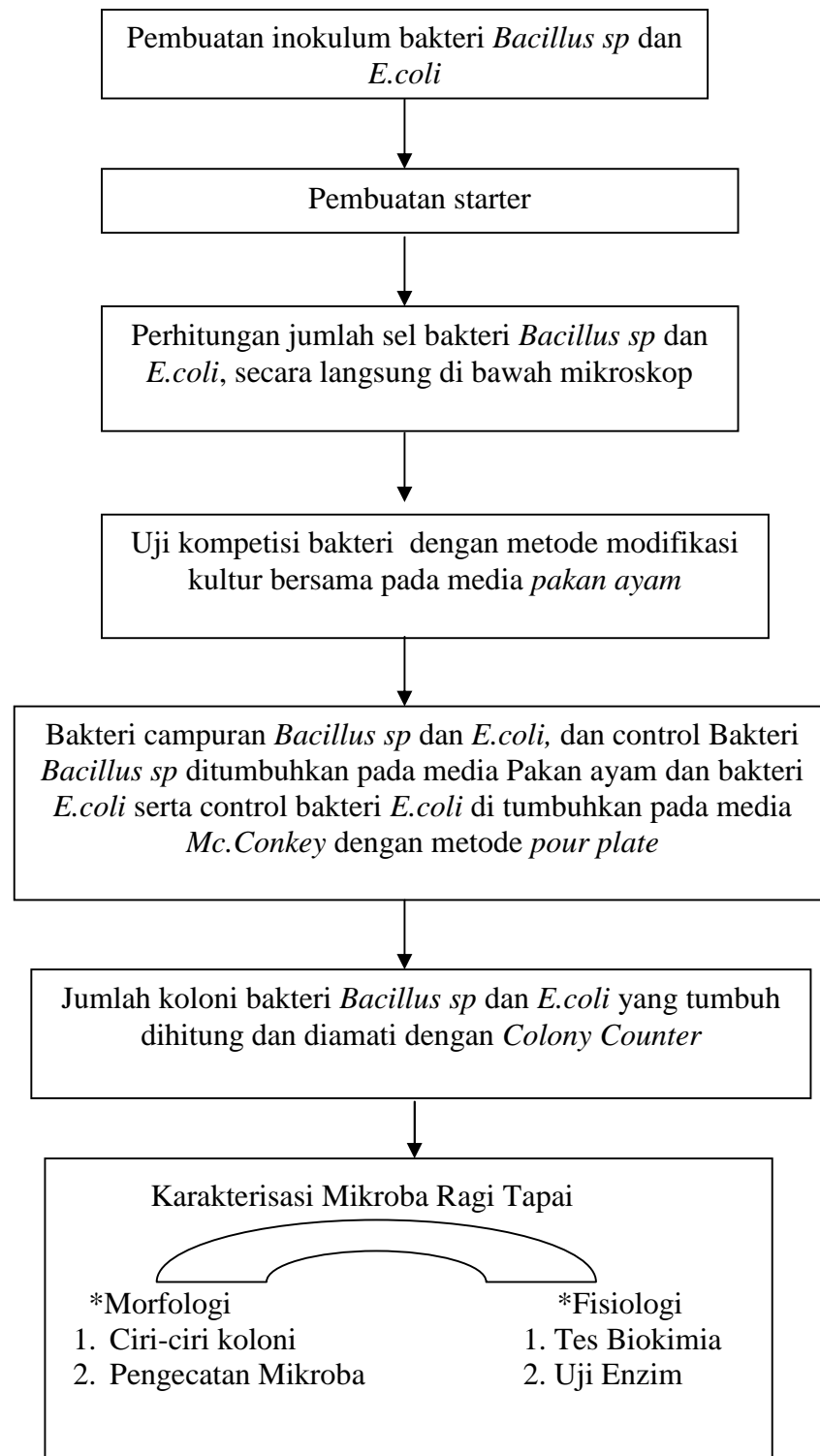
Dari isolat yang diperoleh kemudian di uji fisiologinya, uji fisiologi meliputi uji biokimia. Uji biokimia dilakukan dengan cara :

- a. Mengambil 1 ose dari isolat A₁, B₁ dan C₁ kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing 9 ml aquades steril dan diberi label AA₁, BB₂, dan CC₁ kemudian dihomogenkan menggunakan vortex mixer.
- b. Setelah homogen kemudian 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.

3. 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.
4. 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.
5. Isolat B₁, C₁, dan D₁ juga dilakukan uji biokimia seperti langkah diatas menggunakan media yang sama yaitu Laktosa Broth, Glukosa Broth dan Sukrosa Broth.
6. Setelah dilakukan prosedur uji biokimia seperti pada isolat A₁ kemudian pada isolat B₁, C₁ dan D₁ setelah diinokulasikan ke media Laktosa Broth, Glukosa Broth dan Sukrosa Broth 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
7. Kemudian 36 tabung yang sudah diberi label diinkubasi pada inkubator bakteri selama 24 jam.
8. Diamati perubahan warna pada media, terbentuknya gelembung pada tabung durham dan timbulnya endapan pada dasar tabung reaksi.

G. Diagram Alur Penelitian

Proses pada uji kontak bakteri yang dilakukan dengan metode modifikasi kultur bersama dapat dilihat pada diagram alur berikut ini.



Gambar 1 : Diagram Alur Penelitian

H. Metode Aplikasi Hasil Penelitian dalam Pembelajaran

1. Populasi dan Sampel Penelitian

a. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh SMA di Bandar Lampung .

b. Sampel

Sampel adalah siswa kelas X pada SMA dengan tingkat akreditasi yang berbeda Tinggi, Sedang, Rendah (A, B, C). Kemudian penentuan kelas dilakukan secara acak masing-masing dari tiga SMA yakni SMA Negeri 5 Bandar Lampung, SMA Negeri 12 Bandar Lampung dan SMA PERSADA Bandar Lampung.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain deskriptif sederhana, karena desain hanya bermaksud untuk membuat pencandraan (deskripsi) mengenai situasi dalam kejadian-kejadian yang akan diamati. Metode penelitian yang digunakan adalah metode survei. Menurut Ali (dalam Koestoro dan Basrowi ,2006: 99) metode survei adalah suatu metode penelitian yang dilakukan sekumpulan objek yang cukup banyak dalam suatu jangka waktu tertentu.

3. Prosedur Penelitian

Tahap-tahap yang akan dilaksanakan dalam penelitian ini meliputi :
Perencanaan dan Pelaksanaan. Tahap-tahap tersebut diuraikan sebagai berikut:

a) Perencanaan

Kegiatan perencanaan meliputi:

- 1) Izin penelitian ke SMAN 5, SMAN 12, dan SMA PERSADA Bandar Lampung terlebih dahulu dinuat oleh peneliti
- 2) Diadakan observasi ke sekolah tempat diadakannya penelitian, untuk mendapatkan informasi tentang keadaan kelas yang akan diteliti.
- 3) Ditetapkan sampel penelitian untuk kelas eksperimen.
- 4) Instrumen soal evaluasi dibuat peneliti sesuai dengan silabus dan RPP
- 5) Instrumen evaluasi yang dibuat peneliti yaitu: soal postes berbentuk essay berjumlah 15 soal. Selanjutnya soal diuji validitas ahli dan reliabilitasnya. Dari 15 soal tersebut, 5 soal dipilih untuk digunakan pada pertemuan.
- 6) Angket tanggapan guru dan siswa dibuat untuk mengetahui kualitas instrumen evaluasi yang digunakan.

b) Pelaksanaan

Kegiatan ini berupa kegiatan pembelajaran menggunakan Evaluasi soal, instrumen evaluasi berupa soal yang berbentuk essay berjumlah 5 butir. Pelaksanaan tes adalah setelah pembelajaran materi Kompetisi Bakteri dengan model *Problem Based Learning*

(PBL) menggunakan bahan ajar dan video animasi. Pemberian angket tanggapan guru dan siswa mengenai kualitas soal evaluasi dilaksanakan setelah tes diberikan.

4. Jenis Data dan Teknik Pengambilan Data

Data penelitian ini berupa data tanggapan guru dan siswa diperoleh melalui penyebaran angket. Angket merupakan suatu daftar pertanyaan tertulis untuk memperoleh informasi dari responden. Aspek yang diungkap melalui angket menyangkut aspek materi, konstruksi dan bahasa dari instrumen evaluasi yang telah dibuat. Angket digunakan berupa pertanyaan dengan 2 (dua) alternatif jawaban yaitu ya (Y) dan tidak (T).

5. Teknik Analisis Data

Data mengenai tanggapan siswa dan guru dalam penelitian ini dianalisis secara deskriptif dalam bentuk persentase.

Adapun langkah-langkah analisis data angket adalah sebagai berikut :

- a. Jawaban item pertanyaan dikuantitatifkan dengan memberikan tingkat-tingkat skor untuk masing-masing jawaban.
- b. Frekuensi dihitung untuk setiap kategori jawaban yang ada pada masing- masing faktor. Setiap butir soal angket yang digunakan disusun berdasarkan kriteria yang digunakan yaitu; materi, konstruksi, dan bahasa. Untuk melihat kriteria hasil perhitungan dilihat berdasarkan tabel 3. dibawah ini.

Tabel 3. Kriteria tanggapan guru dan siswa mengenai kualitas instrumen evaluasi.

No	Interval	Pernyataan
1	76%- 100%	Sebagian besar guru/siswa menyatakan kualitas komponen instrumen evaluasi baik.
2	51%-75%	Sebagian guru/siswa menyatakan kualitas komponen instrumen evaluasi baik.
3	25%- 50%	Sebagian kecil guru/siswa menyatakan kualitas komponen instrumen evaluasi baik.

- c. Jawaban dari angket dianalisis secara deskriptif untuk menjelaskan kemampuan yang dimiliki oleh guru dan siswa dalam menerima materi Kompetisi Bakteri.