

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Metode Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian kuantitatif yang berlandaskan data konkret berupa angka-angka yang dapat diukur menggunakan metode statistik (Sugiyono, 2018). Metode penelitian yang digunakan yaitu metode survei untuk memperoleh fakta dari gejala yang ada dan mencari keterangan-keterangan secara faktual (Sangadji dan Sopiah, 2010). Metode pengumpulan sampel yang digunakan adalah *purposive random sampling*, yaitu metode pengambilan sampel dengan menentukan kriteria-kriteria tertentu yang lebih representatif (Sugiyono, 2008). *Purposive Random Sampling* juga diartikan sebagai metode pengambilan sampel secara acak, dan telah ditentukan tempat serta jenis sampel yang akan digunakan (Nasution, 2007).

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan September - November 2023 bertempat di *Integrated Laboratory of Bioproduct (ILAB)*-Badan Riset dan Inovasi Nasional, Kawasan Sains dan Teknologi (KST) Soekarno, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong Jawa Barat 16911 sebagai lokasi pemeriksaan dan pengamatan. Lokasi pengambilan sampel diperoleh dari pembudidaya ikan mas di Desa Pasarean dan Desa Gunung Bunder I, Kecamatan Pamijahan, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Analisis kualitas air secara Spektrofotometri dan Elektrometri dilakukan di Laboratorium Teknologi Lingkungan-BRIN, Gedung 820, Kawasan Puspiptek (Gedung Geostech) Muncul, Kecamatan Serpong, Kota Tangerang Selatan, Banten 15314. Analisis kualitas air meliputi analisis kation dan anion diujikan di Laboratorium Keselamatan Lingkungan (Radiasi)-BRIN, Pasar Jumat, Lebak Bulus, Jakarta.

### 3.3 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan mas pada pembudidaya di Desa Pasarean dan Desa Gunung Bunder I, Kecamatan Pamijahan, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Ikan mas yang diambil sebagai sampel adalah ikan sakit atau ikan (sakit) baru saja mati yang menunjukkan gejala terserang penyakit di bagian tubuh luarnya. Sampel diambil dari kolam air deras di Desa Pasarean dan Desa Gunung Bunder I dengan sumber mata air yang berbeda.

### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain sebagai berikut:

#### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah plastik wayang, cawan petri, kertas buram, plastik tahan panas, sarung tangan karet merk Altamed Nitrile, alumunium foil, tisu, termometer batang, pH meter, *cling wrap*, pipet mekanis 200  $\mu\text{L}$ , 1000 $\mu\text{L}$ , dan 4500  $\mu\text{L}$  merk Eppendorf, *pipette tip*, autoklaf, *laminar air flow*, *beaker glass*, Erlenmeyer, *scalpel* no. 3 merk Marwa, pisau bedah no. 15 merk GEA Medical, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *vortex*, *decoloration shaker*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, timbangan digital, bunsen, korek gas, karet gelang, gunting, *spreader*, tusuk gigi, penggaris, botol kaca 100 ml, *object glass*, *cover glass*, mikroskop binokuler, kamera, dan alat tulis.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel ikan dan bahan lainnya. Ikan yang digunakan yaitu ikan mas yang dipelihara di Desa Pasarean dan Desa Gunung Bunder I, Kecamatan Pamijahan, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Bahan lainnya yang digunakan adalah akuades, NaCl 0.85%, kapas, media selektif (*Salmonella-Shigella agar*,

*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar*, *Endo agar*, dan *Cetrimide agar*), Nutrient Agar dan air uji.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Pengambilan Sampel

Sampel ikan mas yang sakit atau ikan (sakit) baru saja mati diambil secara langsung dari 2 lokasi yang berbeda yaitu Desa Pasarean dan Desa Gunung Bunder I. Pada setiap daerah diambil ikan mas yang sakit atau ikan (sakit) baru saja mati dipilih secara acak pada kolam budidaya. Sampel ikan mas dibawa dalam keadaan mati segar untuk selanjutnya dilakukan pengamatan di *Integrated Laboratory of Bioproduct (ILAB)* Badan Riset dan Inovasi Nasional.

Pengambilan sampel air kolam budidaya ikan mas dan sumber mata air sebagai kontrol digunakan untuk mengukur parameter kualitas air. Pengambilan air dilakukan dengan menggunakan botol kaca 100 ml pada masing-masing kolam tempat pengambilan ikan. Sampel air diambil beriringan dengan pengukuran kualitas air secara insitu dengan mengukur suhu dan pH air serta dilakukan secara grab sampling. Sampel air disimpan pada suhu 4°C hingga sebelum di analisis di Laboratorium uji.

#### 3.5.2 Penyiapan Media

Media adalah campuran bahan-bahan dalam bentuk cairan atau padatan yang mengandung nutrisi seperti protein, karbohidrat, lemak, mineral, dan sumber nutrisi lain yang dibutuhkan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Media yang digunakan pada penelitian ini yaitu media selektif bakteri patogen yang terdiri dari *Salmonella-Shigella (SS) agar*, *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar*, *Endo agar (Endo)*, *Cetrimide agar (Cetrimide)*, *Nutrient (NA) agar*, dan media agar darah. Media selektif mendukung pertumbuhan mikroorganisme jenis tertentu dan menghambat pertumbuhan flora campuran lain. Selektivitas ini diperoleh dengan menambahkan bahan kimia, pewarna,

atau antibiotik pada media. Langkah-langkah yang dilakukan dalam menyiapkan masing-masing media yaitu sebagai berikut:

- a. Penyiapan media *Salmonella-Shigella* (SS) agar
  1. Timbang media *Salmonella-Shigella* (SS) agar dengan menggunakan timbangan digital sebanyak 6.30 g / 100 ml akuades.
  2. Campurkan media SS agar dengan akuades yang sudah ditakar pada tabung Erlenmeyer kemudian dipanaskan diatas *hotplate* sambil di *stirrer* sampai larut.
  3. Tuang media ke dalam cawan petri. Penuangan media dilakukan didalam *laminar air flow*.
  4. Simpan media dalam lemari pendingin hingga akan digunakan.
- b. Penyiapan media *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose* (TCBS) agar
  1. Timbang media *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose* (TCBS) agar dengan menggunakan timbangan digital sebanyak 8.80 g / 100 ml akuades.
  2. Campurkan media TCBS agar dengan akuades yang sudah ditakar pada tabung Erlenmeyer kemudian dipanaskan diatas *hotplate* sambil di *stirrer* sampai larut.
  3. Tuang media ke dalam cawan petri. Penuangan media dilakukan didalam *laminar air flow*.
  4. Simpan media dalam lemari pendingin hingga akan digunakan.
- c. Penyiapan media *Endo* (Endo) agar
  1. Timbang media *Endo* (Endo) agar dengan menggunakan timbangan digital sebanyak 4.15 g / 100 ml akuades.
  2. Campurkan media Endo agar dengan akuades yang sudah ditakar pada tabung Erlenmeyer kemudian dipanaskan diatas *hotplate* sambil di *stirrer* sampai larut.

3. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama  $\pm$  60 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  kemudian didinginkan.
  4. Tuang media ke dalam cawan petri. Penuangan media dilakukan didalam *laminar air flow*.
  5. Simpan media dalam lemari pendingin hingga akan digunakan.
- d. Penyiapan media *Cetrimide* (Cetrimide) agar
1. Timbang media *Cetrimide* (Cetrimide) agar dengan menggunakan timbangan digital sebanyak 4.67 g / 100 ml akuades.
  2. Campurkan media *Endo agar* dengan akuades yang sudah ditakar pada tabung Erlenmeyer kemudian dipanaskan diatas *hotplate* sambil di *stirrer* sampai larut.
  3. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama  $\pm$  60 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  kemudian didinginkan.
  4. Tuang media ke dalam cawan petri. Penuangan media dilakukan didalam *laminar air flow*.
  5. Simpan media dalam lemari pendingin hingga akan digunakan.
- e. Penyiapan media *Nutrient* (NA) agar
1. Timbang media NA dengan menggunakan timbangan digital sebanyak 2.00 g / 100 ml akuades.
  2. Campurkan media NA agar dengan akuades yang sudah ditakar pada tabung Erlenmeyer kemudian dipanaskan diatas *hotplate* sambil di *stirrer* sampai larut.
  3. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama  $\pm$  60 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  kemudian didinginkan.
  4. Tuang media ke dalam cawan petri. Penuangan media dilakukan didalam *laminar air flow*.
  5. Simpan media dalam lemari pendingin hingga akan digunakan.

### 3.5.3 Isolasi Bakteri Patogen

Isolasi bakteri dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang diduga merupakan penyebab terjadinya penyakit pada ikan. Isolasi bakteri menggunakan teknik *spread plate* pada media kemudian dilakukan perhitungan bakteri menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Target isolasi bakteri adalah luka eksternal pada permukaan tubuh/sisik, mulut dan insang. Sampel isolasi dipisahkan antara permukaan tubuh/sisik, mulut, dan insang dengan kode S untuk permukaan tubuh/sisik, M untuk mulut dan I untuk insang. Langkah-langkah yang dilakukan dalam isolasi bakteri patogen adalah sebagai berikut:

- b. Masing-masing sampel diambil beberapa bagian yang terindikasi terdapat bakteri lalu dimasukkan ke dalam 100 ml larutan garam fisiologis 0.85% steril
- c. Homogenkan pada *incubation shaker*
- d. Membuat *serial dilution* atau pengenceran bertingkat dengan ambil 1 ml suspensi yang terbentuk dengan menggunakan mikropipet lalu dimasukkan ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis 0.85% steril dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*, suspensi ini dinyatakan sebagai pengenceran  $10^{-1}$
- e. Pengenceran  $10^{-1}$  kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan garam fisiologis 0.85% sebanyak 9 ml sebagai pengenceran  $10^{-2}$  dan seterusnya sampai pengenceran  $10^{-7}$
- f. Setiap sampel diambil beberapa pengenceran sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam media *Salmonella-Shigella (SS) agar*, *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar*, *Endo agar*, dan *Cetrimide agar* yang telah diberi label dan tingkat pengencerannya.
- g. Suspensi bakteri tersebut disebar dengan menggunakan *spreader* steril diseluruh permukaan media secara merata.

- h. Cawan petri yang berisi media tersebut dimasukkan ke dalam ruang inkubator untuk diinkubasi selama 24 jam
- i. Melakukan perhitungan bakteri dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*).

#### 3.5.4 Purifikasi Bakteri

Pemurnian (*purification*) bertujuan agar diperoleh biakan murni yang diinginkan tanpa ada kontaminan dari mikroba lain. Pemilihan koloni mikroba yang dimurnikan berdasarkan perbedaan kenampakan morfologi koloni, baik dari segi warna, elevasi, tekstur permukaan, garis-garis radial, lingkaran konsentris maupun tetes eksudat sehingga diperoleh isolat murni (Edhar *et al.*, 2017). Purifikasi dilakukan dengan cara memindahkan bakteri pada isolat media dengan menggunakan teknik *streak plate* pada media *Salmonella-Shigella (SS) agar*, *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar*, *Endo agar*, dan *Cetrimide agar* menggunakan metode gores kuadran pada media *Nutrient Agar (NA)*. Pindahan bakteri tersebut menggunakan jarum ose dan kemudian isolat bakteri hasil purifikasi diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan.

#### 3.5.5 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan tujuan agar bakteri awal yang merupakan biakan induk yang masih dalam keadaan dorman menjadi biakan segar sehingga ketika digunakan, bakteri dalam keadaan yang segar (Manalu, 2017). Peremajaan dilakukan dengan mengambil bakteri dari isolat pemurnian dengan menggunakan jarum ose. Teknik peremajaan bakteri menggunakan teknik gores kuadran dengan model penggoresan secara zig-zag. Tahapan peremajaan bakteri yaitu panaskan jarum ose pada api bunsen kemudian tunggu hingga jarum ose dingin, ambil bakteri pada isolat kemudian gores pada media NA dan gores dengan teknik gores kuadran zigzag. Isolat peremajaan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan.

### 3.5.6 Uji Patogenitas

Uji patogenitas dilakukan untuk memastikan apakah kandidat bakteri yang diisolasi bersifat patogen atau tidak (Marlida *et al.*, 2014). Pengujian sifat patogenitas dilakukan dengan menggoreskan koloni yang berbeda menggunakan ose steril diatas *Blood Agar Plates*. Jika bakteri menghasilkan *hemolysis* maka sebuah zona dari hemolisis akan terlihat di atas *Blood Agar Plates*. Ada 3 tipe hemolisis:  $\beta$ -hemolisis (tidak adanya darah di sekeliling koloni),  $\alpha$ -hemolisis (beberapa sel darah dalam zona hemolisis adanya beberapa perubahan warna greenish disekeliling koloni) dan hemolisis (non hemolisis) (Mailoa dan SETHA, 2011). Tahapan uji patogenitas yaitu dengan mengambil bakteri pada isolat menggunakan tusuk gigi steril kemudian letakkan pada *Blood Agar Plates* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruangan.

### 3.5.7 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan dengan terlebih dahulu memberikan 1 tetes akuades pada *object glass* kemudian mengambil bakteri yang telah diisolasi menggunakan tusuk gigi steril dan disuspensikan pada *object glass* yang telah diberi akuades. *Object glass* tersebut difiksasi di atas bunsen. Teteskan kristal violet sebanyak 50  $\mu$ L pada *object glass* hingga menutupi seluruh sediaan lalu diamkan selama 30-60 detik dan cuci dengan akuades sebanyak 3 kali. Slide kemudian ditetesi iodine sebanyak 50  $\mu$ L dan diamkan selama 60 detik. Slide tersebut di decolorisasi dengan menggunakan *decolorizer* dan cuci dengan akuades 3 kali sampai bening. Teteskan safranin sebanyak 50  $\mu$ L dan didiamkan selama 30-60 detik untuk selanjutnya dicuci dengan akuades. Preparat tersebut dikeringkan pada suhu ruangan. Preparat siap diamati di bawah mikroskop.

### 3.5.8 Pengamatan Mikroskop

Pengamatan mikroskop dilakukan pada preparat hasil pewarnaan gram isolat bakteri yang berasal dari isolasi bakteri yang telah teridentifikasi sebagai bakteri patogen dalam uji patogenitas.



Pengamatan yang dilakukan yaitu dengan mengamati bentuk sel bakteri. Bentuk sel yang paling banyak dijumpai yaitu bentuk bulat (*coccus*), bentuk batang (*bacillus*), dan bentuk spiral.

### **3.6 Parameter Penelitian**

#### **3.5.1 Perhitungan TPC (*Total Plate Count*)**

Perhitungan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) yaitu jumlah bakteri yang telah tumbuh di dalam cawan dihitung dengan menggunakan *colony counter* dan kemudian dicatat dan dikalikan dengan banyaknya pengenceran yang telah dilakukan. Jumlah bakteri dinyatakan dalam satuan CFU/ml (*colony-forming unit/ml*).

#### **3.5.2 Pengamatan Koloni Bakteri**

Hasil isolasi bakteri, dapat langsung diamati karakter dari masing-masing jenis bakteri. Karakter yang diamati dalam pengamatan makroskopis antara lain : warna, bentuk, tepian, dan elevasi permukaan.

#### **3.5.3 Pewarnaan Gram**

Uji pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri gram positif dan negatif (Ernawati, 2010). Bakteri gram positif mampu mempertahankan zat warna kristal violet dengan menunjukkan warna ungu dan gram negatif menunjukkan zat warna merah dari safranin (Sari, W.E. *et al.*, 2023).

#### **3.5.4 Pemeriksaan Kualitas Air**

Pengukuran parameter kualitas air dilakukan secara Spektrofotometri dan Elektrometri yang dibedakan dengan parameter fisika dan kimia. Parameter fisika yang diukur antara lain suhu, derajat keasaman (pH) dan salinitas. Parameter kimia yang diukur antara lain COD, Na, K, Ca, Mg, Cl, SO<sub>4</sub>, F, HCO<sub>3</sub>, dan NO<sub>3</sub>.

### **3.7 Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara deskriptif berdasarkan bentuk tabel dan gambar. Data hasil perhitungan *Total Plate Count*

(TPC) dianalisis secara sistematis dan ditabulasikan ke dalam bentuk tabel menggunakan *Microsoft Excel*.