

BAB III

METODE PENELITIAN

1. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif. Menurut Sudjana (2004), Metode deskriptif merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mendeskripsikan atau menggambarkan peristiwa yang sedang berlangsung sebagaimana mestinya pada saat penelitian berlangsung. Berdasarkan masalah yang diteliti, hal tersebut dikarenakan metode deskriptif menyajikan hasil penelitian dalam bentuk deskriptif untuk memberikan gambaran yang lebih jelas tentang situasi-situasi dan lebih spesifik memusatkan perhatian kepada aspek-aspek tertentu dan sering menunjukkan hubungan antara berbagai focus penelitian. Selain itu, metode deskriptif juga menggambarkan situasi atau kejadian yang ada. Masalah yang diangkat dalam penelitian ini yaitu Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pada Saluran Pencernaan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*) Pada Tahap *Elver eel*.

2. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah seluruh bakteri pada ikan sidat (*Anguilla bicolor*) pada tahap *elver eel* yang sudah mati. Sampel penelitian yang digunakan adalah bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor*) pada tahap *elver eel* yang sudah mati.

3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2018 sampai Juni 2018 di Laboratorium Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Pengambilan sampel ikan sidat dilakukan dari akuakultur ikan sidat di Kebun Botani UPI.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Laminar Air Flow* (LAF), Inkubator, Autoklaf, Tabung Durham, Timbangan Analitik, *Hot Plate*, *Vortex*, Mikroskop, Pipet mikro, Lemari pendingin, Cawan petri, Gelas ukur, *Object glass*, *Cover glass*, Tabung reaksi, Sumbat, Rak tabung, Tabung vial, *Microtube*, Tip, Bunsen, Kawat ose, Mortar dan Alu, Beaker glass 1000 ml, *Beaker glass* 1000 ml, *Beaker glass* 200 ml, *Beaker glass* 100ml, Batang pengaduk, Botol reagen 100 ml, Lemari pendingin, Rak tabung, Gelas ukur 1000 ml, Gelas ukur 100 ml, Labu Erlenmeyer 250 ml, Labu Erlenmeyer 500 ml, Pisau bedah, Spatula, Gunting bedah, Pinset, Rak tabung, Botol semprot, Korek, Papan miring, Pipet tetes, pH digital, Bak warna, Rak kawat.

b. Bahan

Isolat bakteri dari saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor*) fase *elver eel* yang sudah mati, Alkohol 70%, Larutan fisiologis 0,85%, Medium TSA (*Tryptic Soy Agar*), Medium TCBS (*Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose*), Medium R-S (*Rimler-Shotts*), Medium SS (*Salmonella Shigella* agar), Akuades, Karbol kristal violet, Larutan lugol, Alkohol 96%, Kertas isap, Larutan safranin, H₂O₂ 3%, Medium SIM agar, Media *Simmons Citrate* Agar, Kertas Oksidase Test S Trip, Medium MR, Medium VP, Reagen Barrit, Medium Hidrolisis Gelatin, Reagen Kovac, Medium Fermentasi karbohidrat (Laktosa), Medium Fermentasi karbohidrat (Sukrosa), Medium Fermentasi karbohidrat (Destroksa), Aluminium foil, Kapas, Plastik tahan panas, Kertas label, Plastik warp, pH *universal*.

5. Prosedur Penelitian

5.1 Tahap Persiapan

a. Penentuan lokasi pengambilan ikan sidat

Lokasi pengambilan ikan sidat dilihat dari sumber ketersediaan, lokasi yang menjadi tempat pengambilan ikan sidat adalah di akuakultur ikan sidat Kebun Botani UPI.

b. Persiapan alat dan bahan

Seluruh alat dan bahan yang dibutuhkan selama penelitian berlangsung dipersiapkan, diperiksa ketersediaannya dan keberfungsian di Laboratorium bioteknologi. Apabila tidak tersedia di laboratorium dipersiapkan sendiri. Alat dan bahan kemudian dibungkus menggunakan plastik tahan panas, kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan reagen dan media

Persiapan teknik pengenceran, teknik pewarnaan, persiapan berbagai medium diantaranya medium TSA (*Tryptic Soy Agar*) sebagai medium perbanyakan bakteri, medium TCBS (*Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose*), medium R-S (*Rimler-Shotts*) dan medium SS (*Salmonella Shigella*) agar sebagai medium selektif. Untuk uji biokimia dipersiapkan juga medium uji SIM (Sulfid, Indol, Motiliti), uji sitrat, uji hidrolisis gelatin, uji fermentasi karbohidrat (Laktosa, Sukrosa, Destroksa), uji Sitrat dan uji MR-VP. Pembuatan reagen dan media yang digunakan dalam penelitian ini secara rinci tercantum pada Lampiran 2.

5.2 Tahap Penelitian

5.2.1 Ekstraksi dan isolasi sistem saluran pencernaan ikan sidat

Ikan sidat tahap *elver eel* yang telah mati sebanyak 5 ekor disterilkan di dalam larutan alkohol 70%, kemudian dibedah dipisahkan bagian kepala dan ekornya, lalu diambil bagian saluran pencernaannya secara aseptik. Saluran pencernaan kemudian dicuci dengan larutan fisiologis 0,85% NaCl kemudian saluran pencernaan ditimbang. Setelah ditimbang saluran pencernaan dihancurkan dan dihaluskan menggunakan mortar dan alu, kemudian ekstrak saluran pencernaan yang sudah halus ditimbang kembali. Saluran pencernaan dicuci dengan garam fisiologis (0,85% NaCl) steril untuk menghilangkan bakteri yang tidak menempel pada saluran pencernaan (Lestari dkk., 2016).

5.2.2 Teknik Pengenceran dan isolasi bakteri pada media

Ekstrak saluran pencernaan dihomogenkan dengan larutan 0,85% NaCl dengan cara ekstrak saluran pencernaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2ml larutan 0,85% NaCl kemudian di vortex selama 3 menit. Setelah itu diambil supernatannya, kemudian dilakukan pengenceran berseri 10^{-1} sampai 10^{-9} pada ekstrak yang telah dihomogenkan dengan larutan 0,85% NaCl. Pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} diambil masing-masing 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berbeda yang telah berisi medium TSA dengan menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*), kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam.

Setelah ditunggu selama 24 jam dilihat pertumbuhan koloni bakterinya. Hasil pengenceran koloni bakteri yang dapat dihitung dipilih untuk dipindahkan ke agar miring. Sebelum dipindahkan ke medium TSA miring, jumlah koloni dihitung terlebih dahulu. Setelah dihitung masing-masing koloni dipindahkan ke dalam TSA miring kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 2x24 jam.

5.2.3 Kultur Selektif

Isolat yang sudah tumbuh pada agar miring TSA (*Tryptic Soy Agar*) dipindahkan ke masing-masing medium selektif RS (*Rimler-Shotts*) agar, SS (*Salmonella Shigella*) agar dan TCBS (*Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose*) agar, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 3x24 jam. setelah itu diamati isolat mana saja yang dapat tumbuh di medium selektif RS (*Rimler-Shotts*) agar, SS (*Salmonella Shigella*) agar dan TCBS (*Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose*) agar.

Tabel 3.1

Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Dari Saluran Pencernaan Ikan Sidat (Anguilla bicolor)

No	Kode isolat	Koloni		Morfologi sel	
		Bentuk	Warna	Tepian	Elevasi

5.2.4 Pewarnaan Gram pada isolat bakteri

Sebanyak satu ose isolat bakteri di goreskan di kaca objek yang sudah diberi satu tetes aquades, kemudian dihomogenkan menggunakan kawat ose. Tuang sediaan dengan karbol kristal violet dan dibiarkan 3 menit, kelebihan zat warna dibuang pada sediaan tersebut. Tuang larutan lugol dan dibiarkan 1 menit. Sediaan di alirkan dengan alkohol 96% selama 1 menit, dan dibilas dengan aquades, dikeringkan dengan kertas isap. Tuang larutan safranin dan dibiarkan 3 menit, cuci lagi dengan aquades, keringkan di udara.

Table 3.2

Pengamatan Mikroskopik Sel Bakteri Dari Saluran Pencernaan Ikan Sidat (Anguilla bicolor)

No.	Mikroskopik sel		
	Kode isolat	Bentuk sel	Sifat gram

5.2.5 Uji Biokimia

a. Uji Oksidase

Sebanyak satu ose isolat bakteri digoreskan pada kertas *Oxidase Test Strip*. Tunggu selama 1 menit, lalu amati hasilnya. Uji positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru violet dan uji negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada kertas *oxidase test strip*.

b. Uji Katalase

Uji Katalase dilakukan dengan meneteskan H_2O_2 3% pada kaca objek steril. Isolat bakteri diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian dipindahkan ke atas kaca objek yang telah ditetesi H_2O_2 3% dan suspensi dicampur secara perlahan menggunakan ose, hasil yang positif ditandai oleh terbentuknya gelembung-gelembung udara (Hadioetomo, 1990).

c. Uji SIM (sulfid indol motility)

Agar SIM adalah agar semisolid yang digunakan untuk menilai adanya hidrogen sulfida, timbulnya indol akibat enzim tryptophanase yang ditandai dengan berubahnya larutan kovac menjadi merah, serta pergerakan bakteri (Steven, 2004).

d. Uji Fermentasi Karbohidrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung-tabung reaksi yang berisi medium fermentasi glukosa, dekstrosa dan sukrosa diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi kuning dan apabila dalam tabung terdapat gelembung, berarti fermentasi tersebut menghasilkan gas (CO₂) (Kusnadi, 2017).

e. Uji Sitrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasi secara zig-zag pada permukaan agar miring media *Simmons Citrate Agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi biru dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media (Sudarsono, 2008).

f. Uji MR-VP

Isolat murni bakteri diinokulasi pada media MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer) dan diinkubasi selama 24 jam. setelah 24jam Ditambahkan 5 tetes reagen *Methyl Red* ke dalam tabung berisi media MR-VP. Hasil tes positif jika terjadi warna merah pada permukaan medium dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen.

Pada uji PV, reagen yang digunakan adalah reagen Barrit yang berisi campuran alcohol α -naftol dan 40% larutan

potassium hidroksida (KOH). Hasil positif VP ditandai dengan adanya warna merah pada saat ditambahkan reagen Barrit, hasil negative tidak akan terjadi perubahan warna (Cappuccino J., 2014).

g. Uji Hidrolisis Gelatin

Uji hidrolisis gelatin dilakukan dengan cara menusukkan isolat murni bakteri pada media yang mengandung gelatin sedalam $\frac{3}{4}$ bagian dari lapisan permukaan. Kemudian dinkubasi selama 24 jam. Larutan gelatin bersifat cair pada suhu kamar dan bersifat padat pada suhu rendah atau dalam refrigerator (Hadioetomo, 1993).

Tabel 3.3

Karakterisasi Isolat Berdasarkan Uji Biokimia

Isolat	Uji Biokimia											
	MRVP		Katalase	Oksidase	Sitrat	Hidrolisis Gelatin	SIM			Fermentasi Karbohidrat		
	MR	VP					Sulfid	Indol	Motil	Laktosa	Sukrosa	Dekstrosa

6. Analisis Data

Data yang telah diperoleh dianalisis secara deskriptif. Hasil isolat bakteri patogen di hitung dengan metode TPC (*Total Plate Count*) menggunakan *Colony Counter* dan hasil uji terhadap isolat-isolat yang diperoleh, dilakukan upaya identifikasi bakteri berdasarkan karakter biokimia sesuai dengan tabel biokimia dengan berpedoman pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dan *Bacterial Fish Pathogens* (Austin dan Austin, 1993).

7. Bagan Alur

