

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian optimasi media pertumbuhan bakteri simbiosis yang berasal dari perairan ujung piring dilaksanakan pada 8 Mei sampai dengan 3 Juli 2020. Penelitian ini bertempat di laboratorium budidaya perairan Unisnu Jepara. Adapun untuk uji optimasi pertumbuhan bakteri dan spektrofotometer dilaksanakan di laboratorium MSTP Universitas Diponegoro Teluk Awur Jepara.

### 3.2 Diagram Alir Penelitian

Pada penelitian yang dilakukan beberapa tahapan sebagai berikut :



### 3.3 Materi penelitian

Adapun materi penelitian yang digunakan dalam penelitian kali ini menggunakan bakteri isolate spons perairan ujung piring Jepara sebagai bahan uji. Sedangkan bakteri *Vibrio harveyi* sebagai bahan penguji.

### 3.4 Alat dan Bahan

#### 3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 3.1. Alat penelitian

No	Alat	Spesifikasi	Fungsi
1	Cawan petri	Diameter 15cm	Tempat uji divusi
2	Inoculating loop		Alat memindahkan isolat bakteri
3	Paper disk		Alat uji difusi
4	Tabung reaksi	Iwaki pyrex 17ml	Tempat media dan isolat
5	Rak tabung reaksi		Tempat tabung reaksi
6	Elemeyer	250 ml 500 ml	Tempat larutan
7	Pipet tetes	10ml	Alat untuk meneteskan atau mengambil larutan dengan jumlah kecil.
8	Mikro pipet	Huawei 20-1000 µl	Untuk mengambil bahan volume mikroliter
9	Bunsen		Untuk membakar zat atau memmanaskan larutan
10	Biological safety cabinet		Tempat melakukan isolasi bakteri
11	Baker glass	500 ml 250 ml	Tempat mengukur volume larutan atau bahan
12	Autoklaf	1210C, 15 lbs	Alat untuk sterilisasi alat dan bahan
13	Refraktometer	Atago masterP/TA	Alat untuk mengukur salinitas
14	Shaker	Eberbach E6010 Reciprocal shaker 115V	Alat yang digunakan untuk memisahkan larutan
15	Sentrifus	6 tabung ecataloge	Memisahkan dan mengendapkan padatan dari larutan
16	Falcon	14 ml	Wadah uji sentrifus
17	Kuvet	4 ml	Wadah uji spektrofotometer
18	Lemari pendingin	Merek Show Case	Tempat menyimpan bahan-

			bahan
19	Spektrofotometer	Uv-Vis spektrofotometer agilent cary 60 UV-Vis	Alat untuk menguji kandungan bakteri
20	Gelas ukur	50 ml	untuk mengukur volume larutan
21	Timbangan	Ketelitian 0,01 gr	untuk menimbang massa media
22	Jangka sorong	merek StrewMac	mengukur diameter koloni bakteri
23	PH meter	0,01 auto calibrate	Untuk mengukur PH
24	Spreader		Menyebarkan cairan pada media agar

### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 3. 2. Bahan penelitian

No	Bahan penelitian	Fungsi
1	Air laut	Bahan pembuatan media
2	Alkohol	Inaktivasi bakteri
3	NA	Bahan pembuatan media NAAL
4	Yeast	Bahan pembuatan media ZBAL
5	Pepton	Bahan pembuatan media ZBAL
6	Glukosa	Bahan perlakuan
7	Fruktosa	Bahan perlakuan
8	Molase	Bahan perlakuan
9	Amonium Chlorida	Bahan perlakuan
10	Amonium nitrat	Bahan perlakuan
11	Urea	Bahan perlakuan
12	PBS	Untuk mencuci bakterin
13	Akuades	Untuk melarutkan bahan
14	Detergent	Untuk membersihkan peralatan penelitian

### 3.5 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium, yaitu suatu penelitian yang dimaksudkan untuk menyelidiki kemungkinan sebab akibat dengan cara mengenalkan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental dan satu atau lebih kondisi perlakuan serta membandingkan hasilnya dengan kondisi perlakuan yang lain (Suryabrata, 2003).

### **3.6 Prosedur penelitian**

Prosedur kerja dirancang untuk nantinya dapat digunakan sebagai langkah dalam sebuah penelitian. Hal ini juga dilakukan untuk mengurangi kemungkinan adanya kesalahan yang akan terjadi saat penelitian berlangsung. Adapun prosedur kerja pada penelitian kali ini adalah Melakukan persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan.

#### **3.6.1 Persiapan alat**

Pada setiap tahapan dilakukan sterilisasi alat yang akan digunakan. Sterilisasi ini bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme yang menempel pada alat yang digunakan sehingga alat yang digunakan dalam kondisi aseptik. Semua alat yang disterilkan sebelumnya dicuci bersih pada air yang mengalir, kemudian dikeringkan. Alat alat yang terbuat dari kaca ditutup menggunakan kain kasa terlebih kemudian di bungkus menggunakan kertas sampai tidak terlihat bagian alat. Sedangkan untuk alat alat selain kaca hanya dibungkus menggunakan kertas ataupun aluminium foil. Alat alat yang sudah dibungkus kemudian dimasukkan kedalam autoclave yang sudah siap dengan suhu 121°C selama 15 menit.

#### **3.6.2 Persiapan media**

##### **1. Media agar**

Media yang digunakan untuk yaitu NA. Pembuatan NAAL menggunakan bahan NA sebanyak 20gram kemudian dicampur menggunakan air laut 1 liter. Proses autoklaf dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit. Media agar digunakan sebagai uji divisi .

##### **2. Media zobell Broth**

Media zobell Broth terdiri dari dua bahan yaitu yeast dan pepton. 1 liter media zobell Broth terdiri dari 1 liter air laut, 1gr yeast, dan 5gram pepton. Media zobell Broth digunakan dalam pembuatan starter isolate, media pertumbuhan vibrio, dan uji pertumbuhan isolate bakteri. Media starter bakteri menggunakan zobell Broth

yang dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5ml kemudian di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

### 3. Media agar miring

Media agar miring terdiri Nutrient agar sebanyak 20gram kemudian dicampur menggunakan air laut 1 liter. Larutan NAAL cair dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 3ml kemudian melalui proses autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media agar tersebut kemudian diletakkan dalam kondisi kemiringan 30°. Media miring digunakan sebagai media kultur isolat murni.

### 4. Pembuatan larutan PBS

Larutan PBS (Phosphat Buffer Saline) terdiri dari beberapa bahan, 1 Liter larutan PBS terdiri dari 800 ml akuades; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; kemudian adjust pH hingga didapatkan nilai 7,4 dengan HCl.

## 3.7 Seleksi Pembentukan biomassa bakteri

### 3.7.1 Prosedur Uji Antagonis dengan Metode Divisi Rasio Zona Hambat Terhadap Vibriosis

Seleksi bakteri untuk biokontrol didasarkan pada uji antagonis terhadap bakteri vibrio *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, dan *Vibrio alginolyticus*. Uji antagonis dilakukan dengan teknik paper disk. Teknik paperdisk dilakukan dengan pengambilan 40 uL suspensi. Kultur bakteri umur 24 jam diteteskan ke atas paper disk pada media NAAL yang telah dinokulasi dengan bakteri vibrio uji. Inkubasi 24 jam pada suhu 30°C. Adanya aktivitas antagonis ditunjukkan oleh terbentuknya daerah tanpa pertumbuhan (zona penghambatan) di sekitar paper disk.

### **3.7.2 Seleksi Nutrien Pertumbuhan**

Seleksi nutrien meliputi sumber karbon dan sumber nitrogen dilakukan menggunakan metode eksperimental. Semua perlakuan dikerjakan 3 kali ulangan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini mengikuti prosedur menurut Polak- Bereka *et al.* (2010) dan Sathyanarayanan *et al.* (2011) yang dimodifikasi.

#### **3.7.2.1 Seleksi sumber karbon**

Pada penelitian ini menggunakan tiga jenis sumber karbon yaitu glukosa, fruktosa dan molase sebagai ko-substrat pada medium zobell broth. Sumber karbon diberikan pada level 1% dalam medium Zobell Broth kemudian diinkubasi selama 48 jam. Selama proses inkubasi dilakukan pengadukan menggunakan orbital shaker. Dilakukan pengamatan tiap jam 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dengan cara pengambilan sampel. Sampel hasil shaker kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 g selama 15 menit. Selanjutnya natan yang terbentuk dilarutkan dengan pbs. Sampel hasil perlakuan kemudian dilakukan uji dengan spektrofotometer untuk mengetahui nilai OD nya. (Annamalai, *et al.* 2011).

#### **3.7.2.2 Seleksi sumber nitrogen**

Pada penelitian ini menggunakan 3 jenis sumber nitrogen yaitu amonium chlorida, amonium nitrat, dan urea. Semua perlakuan diberikan pada level 0,1% dalam medium Zobell Broth kemudian diinkubasi selama 48 jam. Selama proses inkubasi dilakukan pengadukan menggunakan orbital shaker. Dilakukan pengamatan tiap jam 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dengan cara pengambilan sampel. Sampel hasil shaker kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 g selama 15 menit. Sampel hasil perlakuan kemudian dilakukan uji dengan spektrofotometer untuk mengetahui nilai OD nya. (Annamalai, *et al.* 2011).

### **3.7.3 Prosedur uji konsentrasi sumber karbon dan nitrogen terhadap isolat bakteri kandidat**

#### **A. Optimasi konsentrasi sumber karbon**

Sumber karbon yang telah berhasil dipilih berdasarkan eksperimen seleksi sumber karbon selanjutnya dilakukan eksperimen optimasi konsentrasi sumber karbon dalam medium Zobell Broth. penelitian ini menggunakan konsentrasi sumber karbon yaitu 0,5%, 1,5%, dan 2,5%. Konsentrasi Sumber karbon dimasukkan kedalam medium Zobell Broth kemudian diinkubasi selama 48 jam. Selama proses inkubasi dilakukan pengadukan menggunakan orbital shaker. Dilakukan pengamatan tiap jam 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dengan cara pengambilan sampel. Sampel hasil shaker kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 g selama 15 menit. Selanjutnya natan yang terbentuk dilarutkan dengan pbs. Sampel hasil perlakuan kemudian dilakukan uji dengan spektrofotometer untuk mengetahui nilai OD nya. (Annamalai, *et al.* 2011).

#### **B. Optimasi konsentrasi sumber nitrogen**

Sumber nitrogen yang telah berhasil dipilih berdasarkan eksperimen seleksi sumber nitrogen selanjutnya dilakukan eksperimen orientasi konsentrasi sumber nitrogen dalam medium Zobell Broth. Terdapat tiga konsentrasi sumber nitrogen yaitu 0,1%, 0,15%, dan 0,25%. Konsentrasi sumber nitrogen dimasukkan kedalam medium Zobell Broth kemudian diinkubasi selama 48 jam. Selama proses inkubasi dilakukan pengadukan menggunakan orbital shaker. Dilakukan pengamatan tiap jam 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dengan cara pengambilan sampel. Sampel hasil shaker kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 g selama 15 menit. Selanjutnya natan yang terbentuk dilarutkan dengan pbs. Sampel hasil perlakuan kemudian dilakukan uji dengan spektrofotometer untuk mengetahui nilai OD nya. (Annamalai, *et al.* 2011).

#### **3.7.4 Prosedur uji kombinasi Sumber karbon dan nitrogen**

Konsentrasi sumber karbon dan nitrogen yang telah berhasil dipilih berdasarkan eksperimen seleksi konsentrasi sumber karbon dan nitrogen selanjutnya dilakukan eksperimen kombinasi dalam medium Zobell Broth. Konsentrasi sumber nitrogen dan karbon sesuai konsentrasi dimasukkan kedalam medium Zobell Broth kemudian diinkubasi selama 48 jam. Selama proses inkubasi dilakukan pengadukan menggunakan orbital shaker. Dilakukan pengamatan tiap jam 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dengan cara pengambilan sampel. Sampel hasil shaker kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 g selama 15 menit. Selanjutnya natan yang terbentuk dilarutkan dengan pbs. Sampel hasil perlakuan kemudian dilakukan uji dengan spektrofotometer untuk mengetahui nilai OD nya. (Annamalai, *et al.* 2011).

#### **3.8 Analisis pertumbuhan bakteri**

Dinamika pertumbuhan mikroba dapat dipahami dari kurva pertumbuhannya, yang dibuat dengan cara mengukur tingkat pertumbuhan tiap selang waktu tertentu kemudian mengalurkan hasil pengukurannya dalam sebuah grafik yang menunjukkan hubungan antara biomasa pada suhu y versus periode waktu pengukuran pada sumbu x.

Jumlah sel mikroba sangat banyak sehingga untuk memasukkan datanya dalam kurva pertumbuhan, digunakan angka hasil konversi logaritmik. Jika datanya tidak dikonversikan ke nilai log, kurva pertumbuhan dapat dibuat pada kertas logaritma. Penentuan atau penghitungan jumlah sel dapat dilakukan dengan metode langsung atau metode spektrofotometri dengan mengukur nilai OD (optical density = kepadatan bakteri yang terlihat sebagai kekeruhan medium).

Waktu generasi dapat ditentukan menggunakan metode tak langsung dengan ekstrapolasi sederhana dari kurva pertumbuhan. Setelah kurva pertumbuhan terbentuk, pilihlah dua titik pada sumbu y (ordinat) yang merupakan nilai kelipatan dua, misalnya 0,2 dan 0,4. Buat garis lurus horizontal dari kedua titik ke



arah kurva, lalu dari titik potong pada kurva ini tarik garis tegak lurus vertikal ke arah sumbu x (absis). Kedua titik potong pada absis menunjukkan interval waktu yang dibutuhkan oleh populasi sel untuk menggandakan populasinya yang disebut dengan waktu generasi.

Cara lain dapat diperoleh dari hasil penghitungan langsung hasil metode pengenceran menggunakan rumus sbb:

$$G = \frac{t \log 2}{\log b - \log B}$$

G: waktu generasi

b : jumlah sel pada akhir penghitungan

B: jumlah sel pada awal penghitungan

t : interval waktu antara B dan b

Waktu generasi (tg) merupakan waktu yang dibutuhkan oleh bakteri untuk memperbanyak jumlah / massa / komponen sel sebanyak 2x lipat, disebut juga waktu lipat dua. Adapun perhitungannya dapat menggunakan rumus sebagai berikut :

$$tg = \frac{t}{3,3 \log \frac{b}{B}}$$

Keterangan :

G = waktu generasi (jam)

t = selang waktu antara pengukuran jumlah sel pada populasi awal (B) hingga populasi eksponensial (b) (jam)

B = populasi awal (cfu/ml)

b = populasi eksponensial (cfu/ml)

3,3 = faktor konversi log<sub>2</sub> menjaddi log<sub>10</sub>

(Pelczar, *et al.* 2013).

Adapun kecepatan generasi bakteri dapat ditentukan menggunakan rumus :

$$\mu = \frac{2,303(\log n - \log n_0)}{t - t_0}$$

n<sub>0</sub> = jumlah sel awal (ml)

n = jumlah sel setelah t (ml)

t<sub>0</sub> = waktu awal

t = waktu akhir

### 3.9 Berat Basah dan berat kering

Menurut (Yuliana 2008). Pengukuran kadar biomassa bakteri dilakukan dengan cara sebanyak 20 ml sampel disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Natan yang didapatkan dilarutkan dengan PBS sebanyak 10 ml untuk membersihkan sel dari media. Setelah dilarutkan dalam PBS disentrifugasi ulang pada kondisi yang sama dengan sebelumnya.

Endapan sel kemudian dipindahkan ke cawan porselin dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C sampai beratnya konstan. Kemudian cawan porselin berisikan sel kering dimasukkan segera ke dalam desikator, setelah dingin cawan porselin berisi sel kering ditimbang.

Biomasa bakteri basah maupun kering dapat dihitung menggunakan cara berikut:

$$X = Wd - W0$$

Keterangan:

- x = berat bakteri kering/basah (g)
- wd = berat bakteri kering/basah dalam wadah (g)
- w0 = berat wadah kosong (g)

### 3.10 Analisis Data

Pertumbuhan isolat bakteri hasil penelitian diolah secara deskriptif kuantitatif melalui Microsoft Excel 2010. Selanjutnya data diuji normalitas, homogenitas, dan aditivitas melalui program SPSS versi 20. Menurut Andriyanto (2019), bila pada uji normalitas bersifat normal, maka selanjutnya akan diuji sidik ragam melalui analisis *oneway anova* ( $\alpha: 0,05$ ). Hasil analisis *oneway anova* menunjukkan perbedaan nilai respon pada pertumbuhan isolat bakteri, sehingga dilanjutkan dengan uji *Tukey*.