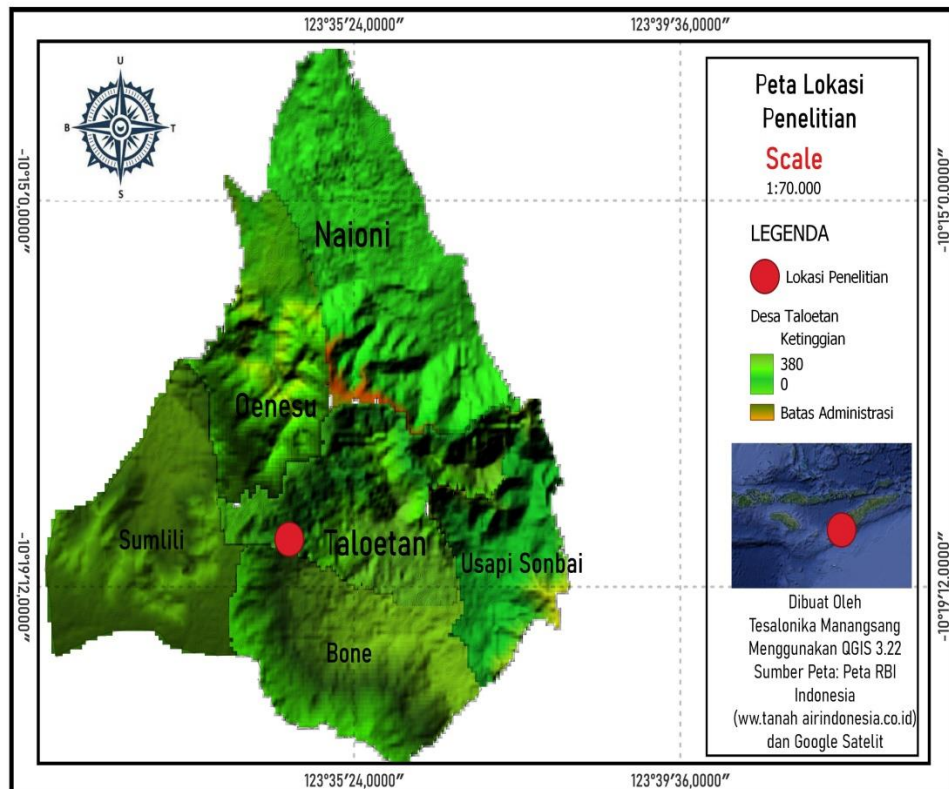


## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung pada bulan Maret - Oktober 2023. Pengambilan sampel dilakukan pada sumber mata air *Science Techno Park* Desa Taloetan Kecamatan Nekamese. Isolasi dan Identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Katolik Widya Mandira Kupang. Lokasi pengambilan sampel dilakukan pada aliran sumber mata air dan titik koordinatnya terletak pada  $10^{\circ} 18' 41''$  lintang selatan dan  $123^{\circ} 34' 34''$  bujur timur.



Gambar 3.1 Peta Lokasi Penelitian

Nekamese adalah sebuah Kecamatan di Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur, yang berjarak kurang lebih 30 km dari Kupang, sepanjang perjalanan disugahi pemandangan yang indah terlihat hutan hijau membentang luas. Namun karena kondisi hujan yang menyebabkan longsor pun semakin melebar ke sisi jalan yang dilewati saat menuju lokasi mata air di desa Taloetan Kecamatan Nekamese.

Untuk masuk ke dalam hutan yang ada sumber mata air diperlukan beberapa warga setempat untuk membantu yakni dengan kearifan lokalnya yang dimaksud antara lain, meminta izin pada leluhur setempat dengan mempersembahkan siri pinang dan ayam saat pengambilan sampel air berlangsung.

Di sekitar mata air terdapat pohon-pohon tinggi dan tumbuhan lain yang penting dalam menjaga keberadaan sumber air di sekitarnya, mata air ini jauh dari pemukiman penduduk dengan topografi di bawah bukit yang dapat menerima aliran air hujan dan ditampung sehingga berbentuk seperti danau di dekat mata air. Berikut beberapa tumbuhan yang hidup disekitaran mata air yaitu : tumbuhan paku, tumbuhan mangga hutan, tumbuhan talas, tumbuhan jambu hutan serta gewang dan beberapa jenis capung yang ditemukan di STP terdiri dari *Stigmatisasi neurothemis*, *Coenagrion lunulatum*, *Megalagrionsp.*, dan *Orthetrum pruinosum* (Semiun et al., 2023)

## 3.2 Alat dan Bahan

### 3.2.1 Alat

Alat yang diperlukan yakni :

1. Botol sampel berfungsi untuk menyimpan sampel air.
2. *Autoclaf* berfungsi untuk sterilisasi alat dan bahan.
3. *Hot plate* berfungsi memanaskan cairan, larutan atau sampel padat.
4. *Beker glass* berfungsi sebagai wadah untuk mencampur, memanaskan atau menyimpan cairan kimia.
5. *Pipette pump* berfungsi membantu pipet dalam menyedot cairan, kemudian pada saat itulah cairan yang telah diperkirakan dipindahkan ke tabung teaksi/erlenmeyer.
6. *Spreader* berfungsi Sebarkan cairan pada permukaan yang dangkal sehingga mikroorganisme yang tersuspensi dalam cairan tersebar merata.
7. *Microtube* berfungsi tempat menyimpan sampel.
8. *Bluetip berfungsi* mengambil larutan dalam ukuran mikro (100µl sampai 1000µl).
9. *Whitetip berfungsi* mengambil larutan dalam ukuran mikro (5 µl sampai 10µl).
10. Jarum ose berfungsi alat yang digunakan untuk melakukan inokulasi.
11. Jarum tusuk berfungsi mengetahui pergerakan bakteri.
12. Objek glass berfungsi sebagai alas untuk meletakkan preparat yang akan diamati pada alat mikroskop.

13. Mikropipet berfungsi untuk mengambil suatu cairan dengan volume terukur.
14. Petridish berfungsi untuk mengembangbiakkan sel atau mikroorganisme. Alat ini juga dapat menjadi tempat sterilisasi sampel dari kontaminasi.
15. Batang pengaduk berfungsi untuk mengaduk media agar terlarut pada aquades.
16. Gelas ukur berfungsi untuk mengukur volume bahan-bahan cairan.
17. Lampu bunsen berfungsi untuk melakukan proses pemanasan pembakaran dan sterilisasi pada setiap alat yang diperlukan.
18. Pipet ukur berfungsi mengukur larutan ke dalam suatu wadah dengan volume tertentu.
19. Tabung reaksi berfungsi untuk mengembangbiakan mikroba dalam media cair.
20. Tabung Durham berfungsi untuk mengetahui terbentuknya gas gelembung atau tidak.
21. Erlenmeyer berfungsi untuk menyimpan media cair.
22. Rak tabung berfungsi untuk menyimpan tabung reaksi selama pemindah sampel.
23. Vortex berfungsi untuk menghomogenkan sampel dan media
24. Inkubator berfungsi untuk menginkubasi sampel uji.

25. Kulkas berfungsi untuk menyimpan bahan yang memerlukan suhu dingin dan sebagai tempat penimbunan untuk menekan perkembangan mikroba.
26. Timbangan analitik berfungsi untuk menimbang media.
27. Mikroskop binokuler berfungsi menjelajahi dan memperhatikan objek berukuran kecil.
28. pH meter berfungsi untuk memperkirakan tingkat pH, khususnya tingkat kebasahan dan keasaman dalam suatu cairan.
29. *Aluminium foil* berfungsi untuk menutupi beaker gelas.
30. Korek api gas berfungsi menyalakan api pada bunsen.
31. Termometer berfungsi untuk mengukur suhu.

### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang diperlukan yakni sampel air, media MSM (*Mineral Salt Medium*), MSA, NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), NaCl 0,8%, kapas, tissue, sarung tangan, masker, kertas lensa, kertas sampul, karet, plastik wrap, spidol, spritus, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, Alkohol 70%, minyak imersi, aquades, *peptone*, *yeast extract*, *phenol red*, glukosa, sukrosa, dextrin, fruktosa, laktosa, NaCl 5%,10%,15%, dan gram A (kristal violet), gram B (lugol), gram C (alkohol), gram D (safranin).

### **3.3 Populasi Dan Sampel**

Populasi dalam penelitian adalah semua mata air yang berada di Science Techno Park Desa Taloetan Kecamatan Nekamese. Sampel pada

penelitian ini adalah mata air yang berada pada 2 titik pengambilan sampel di desa tersebut.

### **3.4 Variabel Penelitian**

Variabel dalam penelitian ini ada dua yakni variabel terikat: keanekaragaman bakteri dan variabel bebas yakni sampel air dari STP (Science Techno Park).

### **3.5 Prosedur Kerja**

#### 1. Tahapan persiapan

Pada tahap ini peneliti memerlukan alat dan bahan yakni sterilisasi alat dan bahan yang diperlukan dan observasi dan pengambilan sampel di lokasi penelitian. Saat pengambilan sampel air, tidak dilakukan pada di sumbernya, melainkan di aliran. Pasalnya, jalan tersebut masih tertutup tumbuh-tumbuhan dan akses pengambilan sampel air sangat sulit.

#### 2. Pengambilan Sampel

Cara pengambilan sampel air yakni : pertama-tama botol sampel disterilisasi lalu botol dicuci dengan air yang dijadikan sampel, setelah itu langsung diarahkan ke sumber mata air untuk mengambil sampel dan sesudah itu botol ditutup rapat dan dibawa ke laboratorium.

#### 3. Isolasi bakteri dari air

- a. Metode agar tuang (Pour Plate) digunakan pada proses isolasi bakteri.
- b. Pengenceran dilakukan dengan seri pengenceran dari  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  pengenceran ini dilakukan untuk pada 2 sampel air.

- c. 45 ml sampel air dimasukkan kedalam 445 ml NaCl 0,85% ( $10^1$ ), kemudian diambil 1 ml dari pengenceran 1, dimasukkan kedalam 9 ml NaCl 0,85% ( $10^2$ ). Lalu dilanjutkan hingga ( $10^3$ ).
- d. Diambil sebanyak 0,1 ml. dari pengenceran 1 lalu dimasukkan ke cawan petri yang telah steril sebanyak 2 cawan (sebagai ulangan 1 dan 2). Dilakukan hal yang mirip dengan pengenceran 2, dan 3.
- e. Diisikan media NA pada cawan yang telah berisi 0,1 mL sampel.
- f. Dan cawan dibungkus tutup dan diinkubasi dengan suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam.

#### 4. Tahap Pemurnian

Disteril jarum ose pada api bunsen, kemudian di ambil bakteri kemudian diambil pada lapisan luar media NA dengan teknik penyebaran untuk memperoleh koloni terpisah.

#### 5. Tahap Karakterisasi

Pengamatan morfologi meliputi : (uji pewarnaan gram, bentuk sel, dan uji motilitas), pengamatan sifat biokimia meliputi : (fermentasi karbohidrat dan uji katalase), dan pengujian sifat fisiologis meliputi: (pH, suhu dan NaCl). Pemilihan genus bakteri dilakukan untuk membandingkan hasil karakterisasi dengan Bergeys's Manual of Determinative Bacteria 9th.

### 1. Pengamatan Morfologi

#### a. Pewarnaan Gram

Dikerjakan dengan langkah awal object glass dibersihkan alkohol

70 % di fiksasi di atas, sebelum ambil isolat bakterinya di bakar jarum osenya dan di oleskan pada kaca objek. Pewarnaan utama diberi perlakuan dengan kristal violet selama 2 menit, iodium selama 1 menit, larutan alkohol 95% selama 30 detik, dan larutan safranin selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan didiamkan hingga kering, setelah itu seluruh rangkaian ditetaskan dengan minyak imersi dan melihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x (Amin dkk., 2023).

b. Bentuk Sel

Mikroba yang telah berkembang kemudian diperhatikan bentuk selnya, agar bisa membedakan bentuknya yakni (kokus, batang atau spiral).

c. Uji Motilitas

Tabung reaksi yang telah berisikan media NA yang telah padat ditusukan isolat bakteri memerukan jarum ose tusuk yang sudah steril. Lalu diinkubasi 24 jam dengan suhu 30°C. Diamati pertumbuhannya negatif atau positif (jika pertumbuhannya lurus maka negatif, dan jika pertumbuhannya lebar maka positif).

## **2. Pengamatan Sifat Biokimia**

a. Fermentasi Karbohidrat

Isolat bakteri ditumbuhkan dalam media Nutrient Broth yang telah ditambahkan NaCl, peptone, yeast extract, phenol red, pada masing-masing gula glukosa, sukrosa, dextrin, laktosa, dan fruktosa. Pengamatan reaksi isolat ditentukan dengan ada atau tidaknya gelembung dari dalam tabung



durham serta pergantian warna media dari merah (-) atau menjadi kuning (+).

#### b. Reduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Uji Katalase

Di teteskan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada objek glass yang telah di bersihkan dengan alkohol 70 % dan di usap dengan tissue, lalu diambil bakteri satu ose dan di celukan pada objek glass tersebut. Pengamatan dilakukan terhadap objek glass dan dilihat ada tidaknya gelembung gas yang terbentuk, bila bakteri mengeluarkan gelembung gas berarti hasilnya positif (+), jika tidak mengeluarkan gelembung udara berarti hasilnya negatif (-).

### 3. Pengujian Sifat Fisiologis

Pengujian sifat fisiologis meliputi pengaruh pH, suhu dan NaCl.

#### 1. Pengaruh pH

Isolat terpilih ditumbuhkan dalam media nutrient broth masing-masing telah dengan pH 3, 7, dan 10 lalu diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24-48 jam. Pertumbuhan diamati pada masa akhir inkubasi yang ditandai dengan perubahan dari warna kuning menjadi warna keruh (+) atau tetap warna kuning (-).

#### 2. Pengaruh suhu

Isolat terpilih ditumbuhkan dalam media nutrient broth lalu diinkubasikan masing-masing pada suhu 15oC, 30oC, dan 50oC selama 24-48 jam. Pertumbuhan diamati pada masa akhir inkubasi yang ditandai dengan pergantian dari warna kuning mewujudkan warna keruh (+) atau tetap warna kuning (-).

### 3. Pengaruh NaCl

Isolat terpilih ditumbuhkan dalam media nutrisi broth yang masing-masing memiliki kadar NaCl 5%, 10%, 15% lalu diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24-48 jam. Pertumbuhan diamati pada masa akhir inkubasi yang dikenali dengan pergantian dari warna kuning menjadi warna keruh (+) atau tetap warna kuning (-).

Untuk mengetahui jenis bakteri hingga tingkat genus, disamakan karakter pada buku Bergeys, Manual of Determinative Bacteria 9th.

#### **3.6 Analisis Data**

Data yang didapat dianalisis secara deskriptif kualitatif yakni menjelaskan secara runut dan runtut yang disandingkan dengan tinjauan pustaka.