

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Sifat penelitian ini adalah penelitian deskriptif kualitatif eksperimen menggunakan perlakuan tanpa pengulangan. Perlakuan yang diberikan adalah menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*) menggunakan sistem 3-3-3 (3 tabung untuk sampel 10ml, 3 tabung untuk sampel 1ml dan 3 tabung 0,1ml). Setiap kolam yang digunakan peneliti di beri perlakuan yang berbeda yaitu P1 kontrol, P2 20%, P3 30% dan P4 40%. Metode MPN (*Most Probable Number*) ini terdiri dari 3 tahap yaitu uji penduga (*presumptive test*), uji penguat (*confirmed test*) dan uji pelengkap (*complete test*).

Uji penduga (*presumptive test*) untuk mengetahui jumlah bakteri per 10ml, 1ml dan 0,1ml pada media *Lactose Broth Double Strength* (LBDS) dan *Lactose Broth Single Strength* (LBSS). Uji penguat (*confirmed test*) untuk mengetahui apakah terdapat bakteri gram positif dan gram negatif dalam pengecatan gram pada kolam ikan nila. Uji pelengkap (*complete test*) untuk membuktikan apakah bakteri yang didapatkan memiliki ciri-ciri bakteri gram positif dan gram negatif setelah air kolam diuji pengecatan gram. Penelitian ini mengamati bagaimana kandungan bakteri gram positif dan gram negatif yang bisa berkurang setelah kolam ikan nila yang sudah di beri perlakuan larutan daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) dan tunggu sekiranya 1hari setiap perlakuan supaya mendapatkan hasil. Pengumpulan data dilakukan dengan pengumpulan air kolam yang sudah diberi larutan daun ketapang (*Terminalia caappa* L.). Pengecekan data tersebut peneliti menggunakan mikroskop dengan teknik pewarnaan gram adakah kandungan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang terdapat dalam air kolam tersebut berkurang atau bisa sebagai antibakteri pada kolam ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

B. Definisi Oprasional

1. Air Kolam Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*.)

Air kolam ikan nila yang digunakan untuk penelitian ini adalah air kolam yang diambil dari kolam peneliti yang sudah di buat. Ukuran kolam ini adalah 100 cm x 80 cm dengan kedalaman 25 cm kemudian menggunakan 1 kolam saja sebagai tempat penelitian dan volume air sebanyak 200 liter.

2. Ketapang (*Terminalia catappa* L.)

Ketapang (*Terminalia catappa* L.) merupakan tanaman yang banyak sekali dapat dijumpai diseluruh wilayah indonesia, memiliki banyak sekali potensi sebagai antibakteri dan banyak digunakan dalam budidaya perikanan. Daun dari pohon ketapang (*Terminalia catappa* L.) telah banyak digunakan sebagai obat tradisional di Indonesia sebab, mengandung senyawa yang berupa zat tanin yang dapat membunuh bakteri atau antibakteri. Daun pohon ketapang (*Terminalia catappa* L.) ini banyak digunakan dalam pembudidaya ikan sebagai alternatif alami untuk mengobati ikan yang terluka. Tetapi masih banyak menggunakan pengalaman mereka dalam memperkirakan konsentrasi daun untuk bahan yang berpotensi alami antibakteri dalam budidaya ikan.

3. Bakteri gram positif dan gram negatif

Bakteri yang diamati dalam penelitian ini adalah bakteri kelompok gram positif dan gram negatif, yang merupakan salah satunya bakteri patogen yang di jadikan sebagai indikator tercemarnya air kolam ikan nila.

4. *Most Probable Number* (MPN)

Most Probable Number (MPN) merupakan metode yang dapat mengidentifikasi bakteri. menggunakan sistem 3-3-3 (3 tabung untuk sampel 10ml, 3 tabung untuk sampel 1ml dan 3 tabung 0,1ml).

5. Pembuatan Media

Pembuatan media merupakan suatu media biakan bakteri dengan komponen kaya akan nutrisi agar bakteri dapat tumbuh pada media. Komposisi media ini salah satu contohnya nutrient agar.

6. Pengecatan Gram

Pengecatan gram dilakukan supaya pada saat mengelompokkan bakteri agar lebih mudah dan mendapatkan hasil yang mana bakteri gram positif dan gram negatif.

7. Sumber Belajar

Sumber belajar merupakan sumber yang bagus berupa data data yang valid dan dapat di gunakan sebagai rujukan untuk proses pembelajaran.

8. Lembar Kerja Peserta Didik (LKPD)

Sumber belajar berupa Lembar Kerja Peserta Didik (LKPD) ini merupakan produk pembelajaran yang di khususkan sebagai pemanfaatan hasil penelitian.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah kolam ikan nila yang telah dibuat dan terdapat banyak ikan nila yang berada dikolam tersebut yang ada didaerah peneliti, peneliti membuat 1kolam ikan nila. Sampel dalam penelitian ini adalah berupa air kolam ikan nila yang berasal dari kolam yang dibuat oleh peneliti sebanyak 100 ml setiap perlakuan.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang di gunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Bak penampungan, pengaduk, kolam ikan nila, buku, pena, mikroskop, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung durham, pipet tetes, objek glass, cover glass, mikropipet, kertas label, tisu, alumunium foil, botol sampel, kertas penghisap, masker dan sarung tangan.

2. Bahan

Adapun bahan-bahan yang di gunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Sampel air kolam, aquades steril, larutan iodin, alkohol 70%, larutan safranin, pepton, laktosa, ekstrak beff dan bromtymol blue.

3. Cara Kerja

a. Pembuatan Air Rendaman Daun Ketapang

Daun ketapang yang sudah gugur dibawah pohon yang berwarna kecoklatan, kemudian dibersihkan terlebih dahulu dan siapkan wadah seperti bak penampungan. Kemudian rendam dengan air kira-kira selama 6-12 jam. Jika sudah, pisahkan air rendaman daun ketapang dengan saringan agar kotoran bekas daun tidak ikut tercampur.

b. Pengambilan Sampel Air

Proses selanjutnya yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan pengambilan sampel air kolam ikan nila yang belum diberi perlakuan apapun. Diletakkan didalam botol yang sudah disterilkan menggunakan alkohol, ambil sebanyak 100ml sampel air kolam untuk diuji MPN (*Most Probable Number*) terlebih dahulu. Sumbat botol tersebut dengan tisu yang sudah disterilkan dengan

alkohol, di sumbat sampai benar-benar tertutup lalu di lapiasi alumunium foil. Kemudian mengambil sampel yang sudah diberi perlakuan kurang lebih 2 hari setelah kolam diberi air rendaman daun ketapang untuk setiap perlakuan diletakkan dibotol yang berbeda dan harus seteril.

c. Prosedur *Most Probable Number* (MPN)

Penelitian ini menggunakan metode MPN 3-3-3, metode MPN terdiri dari 3 tahap yaitu uji penduga (*presumptive test*), uji penguat (*confirmed test*) dan uji pelengkap (*complete test*) dan di lanjutkan dengan pengecatan gram.

1) Uji penduga (*presumptive test*)

Media *Lactose Broth Double Strength* (LBDS) mempunyai komposisi ekstrak beff 3 gram, pepton 5 gram, lactose 10 gram, dan bromthymol blue 0,2%. *Lactose Broth Single Strength* (LBSS) mempunyai komposisi yang sama hanya kadar laktosanya setengah dari LBDS yaitu 5 gram.

- a) Sediakan 3 tabung reaksi LBDS (9 ml tiap tabung) dan 6 tabung LBSS (9 ml tiap tabung). semua tabung reaksi di beri tabung durham dengan menghadap ke bawah tabung durhamnya, supaya mudah saat mengamati adanya gelembung yang menandakan adanya bakteri.
- b) pindahkan sampel sebanyak 10 ml ke tabung reaksi di seri pertama (3 tabung LBDS) secara steril semua.
- c) Selanjutnya sampel 1 ml masukkan ke dalam tabung reaksi seri kedua (3 tabung LBSS).
- d) Kemudian yang terakhir sampel 0,1 ml masukkan ke dalam tabung reaksi seri ketiga (3 tabung LBSS).
- e) Inkubasikan semua tabung tersebut selama kurang lebih 1 hari dengan sangat steril
- f) Setelah di inkubasi selesai melihat hasilnya di setiap tabung yang memiliki gelembung, yang menandakan adanya bakteri pada air kolam ikan tersebut.

d. Pembuatan Media

- 1) Tuangkan aquades 100 ml kedalam erlenmeyer kemudian tuangkan 2,8 gram NA dan tambahkan agar-agar.
- 2) Kemudian dipanaskan dengan hotplate hingga mendidih, serta diaduk terus menerus hingga semua larut.
- 3) Setelah larut kemudian segera tuangkan media NA sebanyak 10 ml kedalam cawan petri menjadi 3. Segera lakukan sebelum larutan mengental.

- 4) Tutuplah cawan petri, kemudian media disterilisasi dengan suhu ruangan dengan diinkubasi selama 1 hari.
- 5) Setelah itu baru ditambahkan dengan larutan MPN dari setiap perlakuan dicawan petri, kemudian diinkubasi kembali selama 1 hari dan media siap digunakan untuk pengecatan gram.

e. Pengecatan Gram

Pengecatan gram dilakukan untuk mengetahui bakteri tersebut termasuk ke dalam kelompok gram positif atau gram negatif. Adapun cara melakukan pengecatan gram sebagai berikut:

- 1) Sterilkan objek glass dengan cara melewatkan di atas bunsen dengan perlahan-lahan
- 2) Mengambil aquades dan teteskan pada objek glass, kemudian ambil media biakan bakteri sampel air kolam yang akan di uji. Kemudian ratakan perlahan lahan hingga tipis jangan sampai tumpah.
- 3) Melakukan fiksasi yakni dengan melewatkan kembali di atas bunsen dengan perlahan-lahan.
- 4) Setelah itu meneteskan larutan kristal violet, kemudian tunggu 1 menit, lalu cuci dengan aquades mengalir jika ada sisa aquades lap dengan tisu.
- 5) Meneteskan larutan iodine dan tunggu selama 1 menit, cuci kembali dengan aquades dan jika ada sisa aquades lap dengan tisu.
- 6) Meneteskan alkohol 95%, tunggu 1 menit dan cuci kembali dengan aquades lalu jika ada sisa aquades lap dengan tisu.
- 7) Meneteskan larutan safranin tunggu selama 1 menit dan cuci dengan aquades lalu mengelap jika ada sisa aquades dengan tisu.
- 8) Keringkan dengan kertas penghisap kemudian mengamati objek glass tersebut di bawah mikroskop, apabila pewarnaan berhasil bakteri gram positif akan berwarna ungu dan jika bakteri gram negatif akan berwarna merah di bawah mikroskop.

f. Membuat Lembar Kerja Peserta Didik (LKPD)

Prosedur terakhir pembuatan Lembar Kerja Peserta Didik (LKPD), LKPD ini dibuat dengan hasil penelitian sebagai sumber belajar biologi.

- 1) Mengumpulkan data hasil penelitian
- 2) Menyesuaikan KI, KD dan Indikator serta materi bakteri yang merugikan manusia sesuai dengan kurikulum 2013.

- 3) Membuat susunan konsep KI KD dan indikator yang ada dalam Lembar Kerja Peserta Didik (LKPD) berupa gambar bakteri gram positif atau gram negatif, yang mana bakteri yang merugikan manusia.
- 4) Mencetak dengan ukuran kertas A4 dan diberi penilaian.

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Hasil Uji Penduga (Presumptive Test)

Tabel hasil pengamatan tabung reaksi yang telah di inkubasi selama 1 hari dengan medium *Lactose Broth Double Strength* (LBDS) dan *Lactose Broth Single Strength* (LBSS).

Tabel 1. Hasil Pengamatan Tabung Reaksi

Sampel	LBDS 3 x 10ml			LBSS 3 x 1ml			LBSS 3 x 0,1ml		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Sampel Kontrol								
Sampel 20%									
Sampel 30%									
Sampel 40%									

Keterangan :

- + : Terdapat gelembung bakteri didalam tabung durham yang ada di setiap tabung reaksi
- : Tidak terdapat gelembung bakteri didalam tabung durham yang ada di setiap tabung reaksi

2. Uji Penguat (Confirmed Test)

Tabel hasil pengamatan objek glass yang memiliki ciri bakteri gram positif dan negatif setelah dilakukan pengecatan gram.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Objek Glass

Sampel	Bakteri Gram Positif	Bakteri Gram Negatif
Sampel Kontrol		
Sampel 20%		
Sampel 30%		
Sampel 40%		

Keterangan :

- + : Bakteri gram positif
- : Bakteri gram negatif

3. Uji Pelengkap (Completed Test)

Tabel potensi setiap perlakuan pada air kolam ikan nila, tiap perlakuan adakah perbedaan atau tidak. Dilihat dengan mikroskop setelah pengecatan gram.

Tabel 3. Pengamatan Setelah Pengecatan Gram

Sampel	Berkurang	Tidak Berkurang
Sampel Kontrol		
Sampel 20%		
Sampel 30%		
Sampel 40%		

Keterangan :

- ✓ : Berkurang
- ✓ : Tidak berkurang

4. Angket Uji Ahli Materi

Petunjuk pengisian

- a. Berilah tanda ✓ pada kolom nilai sesuai penilaian anda terhadap lembar kerja peserta didik.
- b. Kriteria penilaian adalah sebagai berikut:
 - 1 : Sangat kurang (SK)
 - 2 : Kurang (K)
 - 3 : Cukup (C)
 - 4 : Baik (B)
 - 5 : Sangat baik (SB)

Tabel 4. Angket Uji Ahli Materi

NO	Indikator Penilaian	Nilai				
		1	2	3	4	5
1	Kesesuaian pemilihan judul/topik media lembar kerja peserta didik dengan tujuan pembelajaran					
2	Materi yang terdapat pada lembar kerja peserta didik mampu memberikan informasi yang sesuai kepada peserta didik					
3	Penyusunan materi secara berurutan					

4	Penekanan isi pesan dalam lembar kerja peserta didik
5	Penggunaan huruf dan kalimat yang sesuai dengan EYD
6	Pemilihan gambar sesuai dengan materi dan dimengerti
7	Penggunaan bahasa yang baik dan benar
8	Penulisan nama instansi atau sumber informasi pada lembar kerja peserta didik
9	Penggunaan simbol dan istilah dalam materi konsisten
10	Kesesuaian dengan IPTEK

5. Angket Uji Ahli Desain

Petunjuk pengisian

- Berilah tanda ✓ pada kolom nilai sesuai penilaian anda terhadap lembar kerja peserta didik.
- Kriteria penilaian adalah sebagai berikut:
 - 1 : Sangat kurang (SK)
 - 2 : Kurang (K)
 - 3 : Cukup (C)
 - 4 : Baik (B)
 - 5 : Sangat baik (SB)

Tabel 5. Angket Uji Ahli Desain

NO	Indikator Penilaian	Nilai				
		1	2	3	4	5
1	Tampilan keseluruhan gambar pada lembar kerja peserta didik					
2	Isi teks singkat, padat akan informasi					
3	Penggunaan desain media lembar kerja peserta didik kreatif dan inovatif					
4	Tata letak isi pada lembar kerja peserta didik					
5	Kesesuaian pemilihan huruf, ukuran huruf dan pengaturan jarak					
6	Kesesuaian pemilihan gambar, simbol					
7	Keserasian warna dan tulisan					
8	Pesan dan informasi mudah dimengerti oleh pembaca					
9	Kepraktisan media lembar kerja peserta didik					
10	Kebermanfaatan lembar kerja peserta didik					

F. Teknik Analisis Data

Analisis data dilakukan setelah masing-masing tahapan dalam metode (MPN) telah selesai dilakukan untuk 4 sampel. Data penelitian yang sudah didapatkan hasil bakteri pada media LBDS dan LBSS dapat dideskripsikan ada tidaknya gelembung pada setiap perlakuan kontrol, 20%, 30%, dan 40%. Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah berdasarkan:

1. **Uji Penduga** (Presumptive Test), didapatkan gelembung atau tidaknya pada tabung Durham di setiap tabung reaksi dengan medium *Lactose Broth Double Strength* (LBDS) dan *Lactose Broth Single Strength* (LBSS).
2. **Uji Penguat** (Confirmed Test), didapatkan hasil dari pengecatan gram dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop, apabila berwarna merah bakteri tersebut termasuk dalam bakteri gram negatif dan apabila berwarna ungu termasuk bakteri gram positif.
3. **Uji Pelengkap** (Completed Test), didapatkan hasil perlakuan manakah yang bisa menjadi antibakteri pada kolam ikan nila, dapat mengamati perbedaan setiap perlakuan yang diberikan dan bisa menentukan bahwa potensi daun ketapang tersebut bisa digunakan sebagai antibakteri.
4. **Tabel Most Probable Number (MPN)**

Tabel 6. Prosedur Most Probable Number (MPN)

Nomor Tabung Positif			Indeks MPN Per 100 ml	95% Batas Kepercayaan	
10 ml	1 ml	0,1 ml		Terendah	Tertinggi
0	0	1	3	<0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13
1	0	0	4	<0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230

Nomor Tabung Positif			Indeks MPN Per 100 ml	95% Batas Kepercayaan	
10 ml	1 ml	0,1 ml		Terendah	Tertinggi
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

(Sutanto:2019)

5. Perhitungan Hasil Validasi Terhadap Aspek Materi Oleh Ahli Materi dan Ahli Desain

$$P = \frac{x}{xi} \times 100\%$$

Keterangan:

P = Persentase tiap kriteria

x = Skor tiap kriteria

xi = Skor maksimal kriteria

(Wulandari:2017)