

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) faktorial yang terdiri dari dua faktor dengan 4 kali ulangan. Faktor pertama adalah bakteri dengan 3 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah konsentrasi filtrat dengan 4 taraf perlakuan. Penentuan ulangan perlakuan menggunakan rumus Hanafiah (1993) yaitu :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan : **t** = treatment / perlakuan
r = replikasi / ulangan

Berdasarkan rumus tersebut, maka perlakuan dalam penelitian ini untuk masing-masing sampel dilakukan dalam 4 kali ulangan, sehingga keseluruhan menghasilkan 48 kombinasi perlakuan, yaitu 3 x 4 x 4 unit percobaan.

Faktor pertama adalah bakteri diantaranya sebagai berikut :

B1 = *Bacillus mycoides*

B2 = *Klebsiella ozaenae*

B3 = kombinasi *Pseudomonas pseudomallei* dengan *Klebsiella ozaenae*

Faktor kedua adalah konsentrasi filtrat diantaranya sebagai berikut :

K0 = 0 ml

K1 = 0,5 ml

K2 = 1 ml

K3 = 1,5 ml

Tabel 3.1. Kombinasi Perlakuan Antara Bakteri dengan Konsentrasi

Jenis Bakteri	Konsentrasi Filtrat			
	K0	K1	K2	K3
B1	B1K0	B1K1	B1K2	B1K3
B2	B2K0	B2K1	B2K2	B2K3
B3	B3K0	B3K1	B3K2	B3K3

Masing-masing perlakuan tersebut dimasukkan ke dalam 150 ml aquades steril yang berisi 10 ekor larva nyamuk *Aedes aegypti* stadium instar II.

3.1.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : filtrat bakteri endofit kitinolitik
2. Variabel terikat : mortalitas larva dan pupa nyamuk *Aedes aegypti*

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 27 Desember - 27 Mei 2012, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Instrumen Penelitian

3.3.1 Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, beaker glass, tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, neraca analitik, *hot plate*, pengaduk magnetic, autoklaf, inkubator, bunsen spirtus, *Laminar Air Flow* (LAF), penggaris, jarum ose, tusuk gigi, aluminium foil, thermometer suhu, sentrifus, pH meter, kertas indikator pH dan *plastic wrap*. Alat uji perlakuan meliputi gelas plastik, gelas beaker, gelas ukur, pipet tetes, pengaduk, karet, kain

kasa, kapas, alat tulis, kertas label, dan termometer. Alat pengamatan meliputi mikroskop, kamera digital, dan alat tulis.

3.3.2 Bahan

Bakteri endofit yang digunakan adalah *Bacillus mycoides*, *Klebsiella ozaenae* dan *Pseudomonas pseudomallei* yang telah diuji menghasilkan enzim kitinase koleksi laboratorium Mikrobiologi Malang. Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) untuk peremajaan dan perbanyakkan bakteri endofit dan TSB (*Tryptic Soy Broth*). Larva nyamuk *Aedes aegypti* stadium instar kedua (koleksi Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya) Malang dan aquades steril untuk media larva nyamuk *Aedes aegypti*.

3.4 Kegiatan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan yang akan dipergunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Sterilisasi dilakukan dengan cara membungkus alat dan bahan menggunakan aluminium foil.

3.4.2 Penyiapan Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Menyiapkan TSA sebanyak 4 g dan aquades sebanyak 100 ml. Mendidihkan aquades dan memasukkan TSA yang telah ditimbang. Setelah larutan homogen dan mendidih, larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing 5 ml dan menutupnya dengan kapas. Kemudian disterilisasi di

dalam autoklaf selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai media dimiringkan.

Menyiapkan TSB sebanyak 3 g dan aquades sebanyak 10 ml. Mendidihkan aquades dan memasukkan TSB yang telah ditimbang. Setelah larutan homogen dan mendidih, larutan dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi masing-masing 5 ml dan menutupnya dengan kapas. Kemudian disterilisasi selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai media dimiringkan.

3.4.3 Peremajaan Bakteri Endofit Kitinolitik

Setiap akan memulai perlakuan bakteri endofit kitinolitik (*Bacillus mycoides*, *Klebsiella ozaenae* dan *Pseudomonas pseudomallei*) harus diremajakan terlebih dahulu pada media lempeng agar dan TSA miring, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.4.4 Pewarnaan Gram Bakteri Endofit Kitinolitik

Pewarnaan gram bakteri endofit kitinolitik (*Bacillus mycoides*, *Klebsiella ozaenae* dan *Pseudomonas pseudomallei*) dimulai dengan membuat suspensi bakteri dengan memasukkan koloni bakteri (umur 24 - 48 jam). Mengoleskan suspensi pada permukaan obyek gelas steril seluas 2 cm, kemudian dikering anginkan. Supaya sel-sel bakteri benar-benar melekat pada obyek gelas, maka melakukan fiksasi dengan melewati obyek gelas di atas bunsen beberapa kali olesan atau *smear*. Kemudian menggenangi olesan dengan kristal violet selama 1 menit, lalu membilasnya dengan air mengalir secara hati-hati sehingga sebagian besar pewarna terbuang. Menggenangi kembali olesan bakteri dengan larutan

Lughol's iodine selama 1 menit, lalu membilas dengan air mengalir secara hati-hati. Kemudian dikeringkan dengan menempelkan kertas isap. Membilas olesan bakteri dengan menyemprotkan etanol selama beberapa detik, kemudian dikeringkan dengan menempelkan kertas isap. Menggenangi kembali olesan bakteri dengan *safranin counterstain* selama 20 detik, lalu membilas olesan dengan air mengalir dan dikeringkan dengan menempelkan kertas isap. Kemudian melakukan pengamatan di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x.

3.4.5 Persiapan Filtrat Bakteri Endofit Kitinolitik

Produksi metabolik bakteri endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya di dalam medium cair. Fermentasi bakteri endofit dipakai medium TSB (*Tryptic Soy Broth*). Koloni bakteri endofit yang telah diinkubasi pada medium TSA selama 24 jam, kemudian diambil satu sengkeli menggunakan jarum ose dan dipindahkan ke dalam 5 ml medium TSB. Kemudian dilarutkan dengan menggunakan *vortex mixer*, dan dihitung viabilitas bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC) sehingga viabilitas mencapai $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. Suspensi koloni bakteri dipindahkan ke dalam 9 ml medium TSB sebanyak 1 ml pada 50 ml tabung erlenmeyer, diinkubasi pada suhu 30°C menggunakan *shaker incubator* 130 rpm selama 48 jam. Setelah proses fermentasi selesai, masing-masing medium disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit.

3.4.6 Persiapan Larva *Aedes aegypti* L.

Sebelum dilakukan penelitian, disiapkan terlebih dahulu larva nyamuk *Aedes aegypti* stadium instar II (koleksi Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya) Malang. Proses penetasan telur dilakukan di Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya Malang. Telur *Aedes aegypti* direndam dalam aquades steril selama 1 - 2 hari. Pemilihan larva yang berumur 2 hari dilakukan atas dasar keseragaman umur sejak penetasan. Rata-rata larva yang berumur 2 hari telah memasuki tahap instar II. Ukuran larva instar II tidak terlalu kecil sehingga mudah untuk diamati.

3.4.7 Bioassay Kemampuan Bakteri Endofit Kitinolitik

Setelah disiapkan larva Larva *Aedes aegypti* stadium instar II. Maka dilanjutkan dengan penyiapan gelas plastik sebanyak 48 buah. Masing – masing gelas diisi dengan 150 ml aquades dan 10 ekor larva *Aedes aegypti*. Kemudian dimasukkan filtrat bakteri endofit kitinolitik dengan konsentrasi 0,5 ml, 1 ml dan 1,5 ml ke dalam masing-masing gelas plastik sesuai rancangan percobaan. Diletakkan dalam lingkungan yang homogen, kemudian diamati setiap 24 jam dan dihitung jumlah larva dan pupa yang mati sampai hari ke-10.

3.4.8 Pengumpulan Data

Data yang diambil pada penelitian ini adalah data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif berupa morfologi larva nyamuk *Aedes aegypti* L. sedangkan data kuantitatif berupa persentase mortalitas larva dan pupa nyamuk *Aedes aegypti* L selama 10 hari.

3.4.9 Analisis Data

Potensi dan pengaruh pemberian bakteri kitinolitik (*Bacillus mycooides*, *Klebsiella ozaenae* dan *Pseudomonas pseudomallei*) diukur berdasarkan persentase mortalitas larva dan pupa *Aedes aegypti* L selama 10 hari. Angka mortalitas kontrol dikoreksi dengan rumus Abbot (1925), yaitu:

$$\text{Koreksi Mortalitas} = \frac{A - B}{100 - B} \times 100\%$$

Rumus 3.1. Persentase Mortalitas Abbot

Keterangan:

A : Kematian larva dan pupa yang mati *Aedes aegypti* pada Uji

B : Kematian larva dan pupa *Aedes aegypti* pada Kontrol

$$\text{Persentase Mortalitas} = \frac{\sum m}{\sum t} \times 100\%$$

Rumus 3.2. Persentase Mortalitas Abbot

Keterangan:

$\sum m$: Jumlah larva dan pupa yang mati *Aedes aegypti*

$\sum t$: Jumlah total larva dan pupa *Aedes aegypti*

Jika perlakuan nyamuk pada kontrol < 5% maka angka kematian dapat digunakan, sedangkan jika angka kematian 5% - 20% maka kematian harus dikoreksi menggunakan rumus koreksi Abbot (Finney, 1971).

Data kuantitatif yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA (*one way*), kemudian jika ada perbedaan nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan menggunakan uji *Duncans Multiple Range Test* (DMRT) program SPSS 16.

Data kualitatif berupa morfologi pada larva dan pupa nyamuk *Aedes aegypti* yang mati dianalisis secara deskriptif dengan cara dibandingkan dengan larva dan pupa nyamuk *Aedes aegypti* normal.

3.5 Kerangka Penelitian

