

3. METODE

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian tentang “Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar batang Brotowali (*T. crisper* (L.) Miers) terhadap Bakteri *A. hydrophila* secara *In Vitro*” antara lain:

Tabel 1. Alat-alat penelitian

| No. | Alat | Kegunaan |
|-----|--------------------------------|--|
| 1. | Autoklaf | Sebagai alat untuk mensterilkan peralatan yang akan digunakan. |
| 2. | <i>Beaker glass</i> | Sebagai wadah tabung reaksi saat sterilisasi. |
| 3. | Blender | Untuk menghaluskan batang brotowali kering. |
| 4. | <i>Blue tip</i> | Blue tip adalah pelengkap (pasangan) mikropipet yang diletakkan pada ujung pipet. |
| 5. | Bola hisap | Sebagai pasangan dari pipet volume untuk mengambil atau mengeluarkan larutan. |
| 6. | Bunsen | Untuk pengkondisian steril di dalam LAF. |
| 7. | Cawan petri | Sebagai wadah dari media dan bakteri yang akan diamati. |
| 8. | Corong | Untuk mempermudah penuangan larutan ke wadah lain. |
| 9. | Erlenmeyer | Sebagai wadah untuk melarutkan dan memanaskan media. |
| 10. | Gelas ukur | Sebagai wadah untuk mengukur media/larutan. |
| 11. | Gunting | Sebagai alat pemotong benang. |
| 12. | <i>Triangle</i> | Sebagai alat untuk menebar bakteri yang akan ditanam. |
| 13. | <i>Hotplate</i> | Sebagai alat untuk memanaskan media. |
| 14. | Inkubator | Sebagai tempat untuk menyimpan bakteri. |
| 15. | Jangka sorong | Untuk mengukur zona hambat. |
| 16. | Jarum osse | Untuk mengambil bakteri dari media. |
| 17. | Korek Gas | Sebagai sumber api menyalakan bunsen. |
| 18. | LAF(<i>Laminar Air Flow</i>) | Untuk preparasi bahan-bahan mikrobiologi dan sebagai tempat penanaman bakteri agar tidak terkontaminasi dengan udara luar. |

Tabel 1. (lanjutan)

| No. | Alat | Kegunaan |
|-----|---------------------------------|---|
| 19. | Lemari pendingin | Untuk menyimpan ekstrak dan bahan. |
| 20. | Mikropipet | Untuk mengambil larutan dalam skala kecil. |
| 21. | Nampan | Sebagai wadah alat dan bahan penelitian. |
| 22. | Pinset | Untuk meletakkan kertas cakram pada cawan. |
| 23. | Pipit volume | Untuk mengambil larutan dalam skala besar. |
| 24. | Rak tabung reaksi | Sebagai wadah tabung reaksi. |
| 25. | <i>Rotary vacuum evaporator</i> | Sebagai alat untuk memisahkan ekstrak dengan etanol 80%. |
| 26. | Oven | Sebagai alat pengering. |
| 27. | Spatula | Untuk menghomogenkan larutan. |
| 28. | Spektrofotometer | Sebagai alat untuk mengukur kekeruhan. |
| 29. | Sprayer | Sebagai wadah alkohol. |
| 30. | Tabung reaksi | Sebagai wadah untuk peremajaan bakteri. |
| 31. | Timbangan digital | Sebagai alat untuk menimbang ekstrak kasar batang brotowali, media TSA dan TSB padat yang dibutuhkan. |
| 32. | Toples kaca | Sebagai wadah untuk ekstraksi batang brotowali (maserasi). |
| 33. | Vortex | Alat untuk menghomogenkan larutan. |
| 34. | <i>Washing bottle</i> | Sebagai wadah menyimpan aquades. |

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2 dan gambar dapat disajikan pada Lampiran 2.

Tabel 2. Bahan-bahan Penelitian

| No. | Bahan | Kegunaan |
|-----|---|---|
| 1. | Batang brotowali (<i>T. crispa</i> (L.) Miers) | Sebagai bahan yang akan digunakan sebagai ekstraksi untuk menguji kemampuan daya hambatnya. |
| 2. | Bakteri <i>A. hydrophila</i> | Sebagai bakteri yang digunakan pada saat perlakuan uji daya hambat. |
| 3. | Kertas label | Sebagai bahan penanda. |
| 4. | Alkohol 70% | Sebagai bahan aseptis pada tangan. |
| 5. | TSA (<i>Tryptone Soy Agar</i>) | Sebagai media tumbuh bakteri dalam bentuk agar. |
| 6. | TSB (<i>Tryptone Soya Broth</i>) | Sebagai media tumbuh bakteri dalam bentuk cair. |
| 7. | DMSO 10% | Sebagai bahan pengencer ekstrak kasar batang brotowali. |

Tabel 2. (lanjutan)

| No. | Bahan | Kegunaan |
|-----|---------------------|---|
| 8. | Aquades | Sebagai bahan pelarut dalam pengenceran bakteri <i>A.hydrophila</i> . |
| 9. | Etanol 96% | Sebagai bahan pelarut batang brotowali pada proses perendaman (maserasi). |
| 10. | <i>Tissue</i> | Sebagai bahan pembersih alat yang telah digunakan. |
| 11. | Alumunium foil | Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian <i>beaker glass</i> dan erlenmeyer pada saat disterilkan. |
| 12. | Kapas | Sebagai bahan untuk menutupi alat pada saat sterilisasi. |
| 13. | Plastik | Sebagai bahan untuk menyimpan petri pada saat diinkubator. |
| 14. | Kertas Koran | Sebagai bahan untuk membungkus peralatan yang akan disterilisasi. |
| 15. | Kertas cakram 6 mm | Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak kasar yang digunakan. |
| 16. | Kertas saring | Sebagai alat untuk menyaring bahan setelah maserasi. |
| 17. | Tali Kasur | Sebagai bahan untuk mengikat peralatan yang akan disterilisasi. |
| 18. | NaCl | Sebagai bahan pembuatan Na Fisiologis. |
| 19. | Spiritus | Sebagai bahan bakar untuk bunsen. |
| 20. | Lap kering | Sebagai bahan untuk membersihkan alat-alat yang telah digunakan. |
| 21. | Sarung tangan | Sebagai bahan pengkondisian aseptis pada tangan. |
| 22. | Karet gelang | Sebagai bahan mengikat tutup toples maserasi. |
| 23. | Masker | Sebagai bahan pengkondisian aseptis . |
| 24. | <i>Plastic wrap</i> | Sebagai pembungkus botol sampel. |

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode eksperimen. Metode eksperimen merupakan langkah-langkah lengkap yang diambil sebelum eksperimen dilakukan agar data yang semestinya diperlukan dapat diperoleh sehingga analisis menjadi objektif. Variabel bebas dijadikan sebagai variabel eksperimen, variabel penyebab atau variabel perlakuan yang karakteristiknya diyakini dapat menghasilkan perbedaan, sedangkan variabel terikat atau variabel

akibat merupakan hasil dari suatu penelitian. Dikatakan terikat karena tergantung atas variabel bebas (Umar, 2005).

Sedangkan untuk teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung. Menurut Chariri (2009), observasi dilakukan dengan cara mengamati secara langsung perilaku individu dan interaksi mereka dalam setting penelitian. Oleh karena itu, Peneliti harus terlibat langsung dalam kehidupan sehari-hari subyek yang dipelajari. Dengan cara ini peneliti dapat memperoleh data khusus di luar struktur dan prosedur formal organisasi. Dalam *participant observation*, peneliti melakukan kegiatan sebagai berikut:

- a) Melibatkan diri dalam aktivitas sehari-hari mencatat kejadian, perilaku dan setting social secara sistematis (apa yang terjadi, kapan, dimana, siapa, bagaimana). Adapun data yang dikumpulkan selama observasi adalah: deskripsi program, perilaku, perasaan, dan pengetahuan;
- b) Wujud data adalah catatan (field note): Apa yang terjadi, bagaimana terjadinya, siapa yang ada di sana;
- c) Catatan semua kejadian atau perilaku yang dianggap penting oleh peneliti (Bisa berupa *checklist* atau deskripsi rinci tentang peristiwa atau perilaku tertentu).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan Acak Lengkap RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2000).

Rancangan penelitian yang akan digunakan adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) karena media yang digunakan bersifat homogen, artinya

keragaman antara satuan percobaan tersebut kecil, sehingga yang mempengaruhi hasil penelitian hanya faktor kebetulan.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}; i = 1, 2, \dots, t$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

Keterangan:

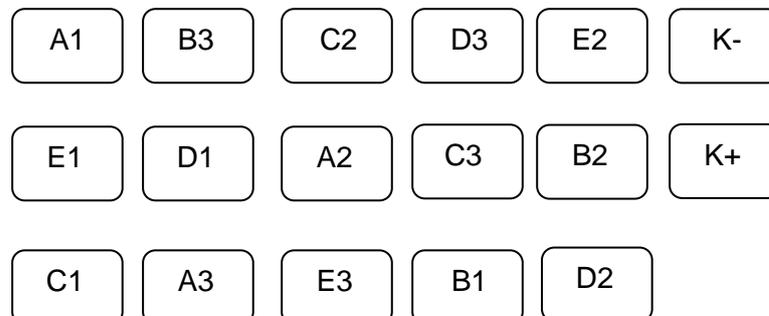
Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

μ = nilai tengah umum.

T_i = pengaruh perlakuan ke-i.

ε_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

Rancangan percobaan yang digunakan yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 2 kontrol yang masing-masing dilakukan 3 kali ulangan. Pengacakan dilakukan agar analisis data yang dilakukan menjadi sah (benar). Variabel bebas pada penelitian ini yaitu perlakuan pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa (L.) Miers*) dengan perlakuan menggunakan perbedaan dosis ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa (L.) Miers*) terhadap bakteri *A. hydrophila*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat minimal yang tepat dalam penggunaan ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa (L.) Miers*). Penempatan dilakukan secara acak disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Rancangan Penelitian

- A : Pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) dengan dosis 250 ppm.
- B : Pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) dengan dosis 500 ppm.
- C : Pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) dengan dosis 750 ppm.
- D : Pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) dengan dosis 1.000 ppm.
- E : Pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) dengan dosis 1.250 ppm.
- K- : Perlakuan pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) dengan dosis 0% (kontrol negatif).
- K+ : Perlakuan pemberian ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) murni (kontrol positif).
- 1, 2 dan 3 : Ulangan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum alat dan bahan yang akan digunakan saat penelitian maka perlu dilakukan proses sterilisasi. Hal ini bertujuan untuk membunuh semua mikroorganisme yang tidak dikehendaki yang menempel pada alat dan bahan. Proses sterilisasi tersebut adalah sebagai berikut ini:

- Alat-alat yang akan digunakan dicuci dengan menggunakan sabun cuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas koran dan diikat menggunakan tali kasur.
- Aquades dituang ke dalam autoklaf secukupnya, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.

- Tombol ON ditekan, ditunggu sampai suhu mencapai 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup autoklaf.
- Tombol OFF ditekan, ditunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian dibuka kran uap dan penutup autoklaf dengan cara simetris.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

b. Sterilisasi Tempat Perlakuan

Selain alat dan bahan, tempat dan laboran harus steril untuk menghindari kontaminan. Tangan laboran yang bersinggungan dengan meja dan barang di sekitar tempat perlakuan harus selalu dalam kondisi aseptis. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 70% maupun cara fisika dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran sinar UV. Pada penelitian ini sterilisasi tempat dilakukan dengan menggunakan sinar UV yang terdapat pada *Laminary Air Flow* (LAF).

c. Pembuatan Ekstrak Batang Brotowali (*T. crispa* (L.) Miers)

Proses pembuatan ekstrak kasar dimulai dengan menyiapkan batang brotowali. Batang brotowali kering didapatkan di Balai Penelitian Tanaman Obat (Medica) kota Batu. Kemudian 1 kg batang brotowali kering tersebut di blender hingga menjadi serbuk. Serbuk batang brotowali tadi kemudian dicampur dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 3. Serbuk batang brotowali kering 250 gram dimasukkan ke dalam toples dan diberi pelarut etanol 96% sebanyak 750 ml kemudian dihomogenkan dengan diaduk menggunakan spatula. Toples ditutup dengan aluminium foil agar etanol tidak menguap. Proses maserasi ini didiamkan selama 3x24 jam pada tempat yang gelap. Setelah 3x24 jam hasil

maserasi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan dengan endapannya. Setelah terpisah, larutan hasil saringan kemudian di uapkan selama kurang lebih 4 jam untuk mendapatkan ekstrak murni dari batang brotowali. Proses penguapan ini menggunakan alat yang disebut *rotary evaporator*. Setelah diuapkan maka akan dihasilkan ekstrak murni berupa pasta sebanyak 16 gr (nilai rendemen ekstrak = $\frac{16 \text{ gr}}{250 \text{ gr}} \times 100\% = 6,4 \%$). Hasil ekstrak kasar tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol film dan dibungkus aluminium foil untuk menghindari cahaya yang masuk kemudian dimasukkan ke lemari pendingin. Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan DMSO 10% untuk perlakuan dosis yang diinginkan.

d. Pembuatan Media

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari BBPAP (Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau) Jepara, Jawa Tengah dengan kepadatan 10^8 sel/ml sebanyak 10 ml. Bakteri yang digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) adalah bakteri dengan kepadatan 10^7 sel/ml. Pembiakan bakteri meliputi pembuatan media diantaranya sebagai berikut:

A. Media TSA (Tryptone Soy Agar)

Media TSA digunakan sebagai media untuk peremajaan bakteri. Dosis yang digunakan dalam pembuatan TSA sebesar 40 gr/L. Adapun proses pembuatan media agar miring adalah sebagai berikut:

- Media TSA ditimbang 11,2 gr dengan menggunakan timbangan digital.
- Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 280 ml aquades.
- Diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen/aluminium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Dituang pada cawan petri ditunggu dingin dan gunakan atau simpan pada lemari pendingin dengan diberi label.

b. Media TSB (*Tryptone Soya Broth*)

Media TSB merupakan media cair yang digunakan untuk kultur bakteri *A. hydrophila*. Adapun proses pembuatan media TSB adalah sebagai berikut:

- Media TSB ditimbang sebanyak 6 gr dengan menggunakan timbangan digital dan dilarutkan dalam 200 ml aquades dalam erlenmeyer kemudian diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Erlenmeyer ditutup kapas dan aluminium foil lalu dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat, kemudian media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

c. Pembiakan Bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari BBPAP (Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau) Jepara, Jawa Tengah dengan kepadatan 10^8 sel/ml. Isolat murni yang kemudian diremajakan pada media agar miring yaitu dengan menggunakan media TSA. Adapun prosedur yang dilakukan dalam peremajaan bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut:

- Siapkan media agar miring yang masih steril (untuk bakteri *A. hydrophila* menggunakan media TSA).
- Panaskan jarum ose yang akan digunakan sampai berwarna merah menyala kemudian dinginkan jarum ose pada ujung media agar TSA.
- Buka penutup kapas pada tabung reaksi berisi bakteri kemudian panaskan ujung tabung terlebih dahulu di atas bunsen.

- Ambil satu inokulan bakteri dari hasil peremajaan sebelumnya kemudian goreskan pada media agar yang masih steril di dekat bunsen yang menyala.
- Setelah itu, media hasil goresan tadi diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C untuk melihat pertumbuhan bakteri.

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali dengan metode gores menggunakan media cair yaitu TSB. Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut:

- Peralatan yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu, kemudian disiapkan media TSB (*Tryptone Soya Broth*) sebanyak 6 gr dalam erlenmeyer sebanyak 200 ml.
- Jarum osse dipanaskan di atas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum osse disentuhkan ke biakkan murni *A. hydrophila* kemudian dicelupkan ke TSB yang sudah dingin.
- Larutan TSB dibiarkan 12-24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. setelah 24 jam, media TSB akan keruh menandakan bakteri telah tumbuh.
- Untuk melihat kepadatan bakteri dapat menggunakan metode Mc. Farland yaitu suatu metode dengan mencocokkan kekeruhannya berdasarkan kepadatan bakteri pada Mc. Farland. Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu 10^8 CFU/ml. Kepadatan 10^8 CFU/ml didapatkan dengan cara mencocokkan kepadatan bakteri pada media cair TSB dengan Mc. Farland berdasarkan kekeruhannya. Hasil dari Mc. Farland yaitu 10^8 CFU/ml.
- Disiapkan cawan petri yang sudah berisi media TSA. Bakteri yang sudah dibiakkan kemudian diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan 0,9% kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- Bakteri disebar dengan cara penyebaran pada seluruh media TSA secara merata menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*).

- Bakteri diambil menggunakan mikropipet sebanyak 0,1 ml dan disebar menggunakan *triangle* yang terlebih dahulu disterilisasi dengan cara dibakar, ketika sudah dingin penyebar dapat digunakan.
- Media yang telah berisi bakteri yang telah disebar kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

d. Cara Memperoleh Bakteri *A. hydrophila* dengan Kepadatan 10^7 sel/ml

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah dengan kepadatan 10^8 sel/ml. Kepadatan bakteri yang digunakan untuk uji antimikroba ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) adalah 10^7 sel/ml. Adapun prosedur untuk memperoleh bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sel/ml adalah sebagai berikut:

- Kultur bakteri dengan kepadatan 10^8 sel/ml pada media TSB disiapkan dan dihomogenkan dengan *vortex*.
- Natrium fisiologis dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml dan ditambahkan 1 ml bakteri dengan kepadatan 10^8 sel/ml dan didapatkan bakteri dengan kepadatan 10^7 sel/ml.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Uji MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum suatu senyawa antimikroba yang terkandung dalam ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Pengamatan MIC dilakukan dengan pengamatan kualitatif yakni dengan melihat kekeruhan pada media uji. Selain itu, dicari nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada tiap tabung uji. Adapun prosedur melakukan uji MIC adalah sebagai berikut:

- 8 tabung reaksi yang sudah berisi media TSB steril sebanyak 4,5 ml disiapkan terlebih dahulu.
- Ekstrak kasar batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) sebanyak 0,5 ml diberikan pada 8 tabung reaksi dengan dosis yang berbeda setiap tabungnya. Adapun dosisnya terdiri dari 1.000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0,1 ppm dan 0,01 ppm. Pada 2 tabung reaksi sisa dijadikan kontrol positif dan kontrol negatif.
- Setiap tabung reaksi diberi isolat bakteri sebanyak 0,1 ml.
- Media diinkubasi di inkubator dengan suhu 32°C selama 24 jam.
- Media dicek kekeruhannya dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer.
- Nilai absorbansi antara perlakuan dicocokkan dengan nilai absorbansi kontrol positif. Nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif artinya memberikan pengaruh sehingga dapat digunakan untuk penentuan dosis pada MIC selanjutnya.

b. Uji Kertas Cakram

Uji kertas cakram digunakan untuk mengetahui ekstrak batang brotowali (*T. crispa* (L.) Miers) pada konsentrasi tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang bersifat bakteriostatik (menghambat bakteri) setelah diinkubasi selama 24 jam yang ditandai dengan terdapatnya zona bening setelah dilakukan inkubasi. Selain itu, bakteri yang bersifat bakteriosidal (membunuh bakteri) setelah diinkubasi selama 48 jam yang ditandai dengan ukuran zona bening tidak mengalami perubahan. Adapun prosedur uji kertas cakram adalah sebagai berikut:

- Disiapkan cawan petri yang telah terdapat media TSA.
- Disiapkan dosis ekstrak kasar batang brotowali untuk uji cakram.

- Penanaman bakteri pada media TSA dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri dari TSB dengan menggunakan metode sebar.
- Metode sebar dilakukan cara menuang 20 ml media TSA steril terlebih dahulu ke dalam cawan petri dan dibiarkan sampai media dingin.
- Bakteri yang sudah diencerkan kemudian diambil menggunakan mikropipet sebanyak 0,1 ml.
- Kemudian disebar dengan *triangle* yang disterilisasi menggunakan etanol dan dibakar. Biasanya penyebaran dilakukan pada suhu 32°C.
- Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak kasar batang brotowali selama 15 menit berdasarkan dosis yang telah ditentukan.
- Kertas cakram yang telah direndam ekstrak kasar batang brotowali ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.
- Dibaca hasil setelah diinkubasi ada suhu ruang 37°C selama 24 jam dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong.
- Jarak kertas cakram dengan tepi cawan petri tidak boleh kurang dari 15 mm.
- Jika jumlah kertas cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram tidak boleh kurang dari 24 mm.
- Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser karena akan mengurangi validasi pengukuran.

3.5 Parameter Uji

Parameter uji dalam penelitian ini terdiri dari parameter utama dan penunjang. Parameter utama dalam penelitian ini adalah parameter uji yang berupa ukuran zona hambat yang dihasilkan setelah uji kertas cakram dengan menggunakan ekstrak kasar batang brotowali dalam satuan millimeter (mm). Parameter penunjang pada penelitian ini yaitu suhu inkubasi yang digunakan

untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* selama penelitian yakni sebesar 32°C dan lama perendaman kertas cakram selama 15 menit.

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisis uji keragaman atau uji F (ANOVA) dengan metode yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan 99% ($\alpha = 0,01$). Hal ini digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter ukur (uji F atau sidik ragam). Jika data sidik ragam memperlihatkan pengaruh berbeda nyata maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT). Selanjutnya untuk mengetahui hubungan atau regresi antara perlakuan dengan diameter zona hambat (zona bening) dilakukan uji polynominal orthogonal.