

### 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Berikut alat beserta fungsinya yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 1:

**Tabel 1.** Alat Penelitian

Alat	Fungsi
Blender	Sebagai alat untuk menggiling kulit daun lidah buaya kering
Gunting	Sebagai alat pemotong bahan
Gelas ukur	Sebagai alat dalam mengukur bahan larutan
Corong	Sebagai alat pembantu penuangan larutan
<i>Autoclave</i>	Sebagai alat untuk mensterilisasi alat dan bahan
Timbangan sartorius	Sebagai alat untuk menimbang berat ekstrak daun lidah buaya, media TSA dan TSB yang dibutuhkan
<i>Cutton Swap</i>	Sebagai alat untuk menggosokkan bakteri pada media TSA saat hendak uji cakram
Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam skala mikrometer
Lemari pendingin	Sebagai wadah penyimpanan bahan penelitian
<i>Hotplate</i>	Sebagai alat untuk memanaskan media TSA sehingga homogen
Cawan petri	Sebagai wadah pengkulturan bakteri
<i>Laminar Air Flow</i>	Sebagai tempat pengkulturan bakteri dalam keadaan steril
Jarum osse	Sebagai alat untuk mengambil dan mengkultur bakteri pada media TSA miring
Toples Kaca	Sebagai wadah perendaman daun lidah buaya saat proses maserasi
Vortex	Untuk menghomogenkan larutan
Tabung reaksi	Sebagai wadah dari larutan
Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi
Erlenmeyer	Sebagai wadah dari media TSA dan TSB
<i>Rotary vacum evaporator</i>	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak daun lidah buaya
Spatula	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
Inkubator	Sebagai wadah penyimpanan bakteri uji
Jangka sorong	Untuk mengukur zona hambat bakteri

### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan beserta fungsinya yang digunakan dalam penelitian ini sebagaimana terdapat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Bahan penelitian

Bahan	Fungsi
Daun lidah buaya ( <i>A. vera</i> )	Sebagai bahan yang hendak diuji kemampuan daya hambatnya
Bakteri <i>P. fluorescens</i>	Sebagai bahan uji daya hambat
Alkohol 70%	Sebagai bahan pengkondisian aseptis pada tangan
TSA ( <i>Triptycase Soy Agar</i> )	Sebagai bahan tumbuh bakteri dalam bentuk agar
TSB ( <i>Triptycase Soy Broth</i> )	Sebagai bahan tumbuh bakteri dalam bentuk cair
Tali kasur	Sebagai bahan untuk mengikat kertas koran pada saat proses sterilisasi
<i>Tissue</i>	Sebagai bahan untuk membersihkan alat yang telah digunakan
DMSO 10%	Sebagai bahan pengencer ekstrak
Kapas	Sebagai bahan untuk menutup tabung reaksi dan <i>erlenmeyer</i> yang hendak disterilkan
Metanol Pro Analisis	Sebagai bahan pelarut kulit daun lidah buaya pada proses perendaman
Kertas Saring	Sebagai bahan untuk menyaring ekstrak basah kulit daun lidah buaya
Akuades	Sebagai bahan pelarut dalam pengenceran bakteri
Alumunium Foil	Sebagai bahan untuk menutup ujung tabung reaksi dan <i>Erlenmeyer</i> pada saat disterilkan
Spiritus	Sebagai bahan bakar dari bunsen
Kertas cakram 6mm	Sebagai bahan untuk mengetahui besar daya hambat ekstrak kasar kulit daun lidah buaya
Kertas Koran	Sebagai bahan untuk membungkus alat yang hendak disterilkan
KOH 3%	Sebagai bahan indikator adanya <i>viscous</i> pada saat uji gram
Kertas tetrametil	Sebagai bahan indikator perubahan warna saat uji oksidase
Larutan Pepton Media O/F	Sebagai bahan indikasi kekeruhan pada uji motilitas
Parafin cair	Sebagai bahan untuk pengujian sifat bakteri oksidatif fermentatif
Parafin cair	Sebagai bahan indikasi uji O/F sifat bakteri fermentatif

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Menurut Natzir (1999), penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan dari penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk penelitian.

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu dengan cara pengamatan secara langsung terhadap gejala-gejala obyek yang diteliti baik situasi sebenarnya maupun dalam situasi buatan dalam rangka pengujian hipotesis (Surachmad, 1986).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Rumus dari model RAL (Yitnosumarto, 1991) adalah sebagai berikut :

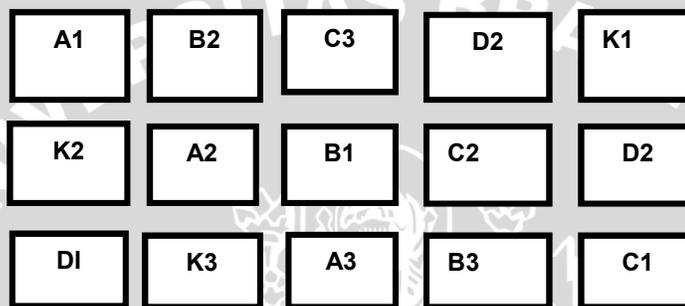
$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Keterangan:

- Y : Nilai pengamatan  
 $\mu$  : Nilai rata-rata harapan  
T : Pengaruh perlakuan  
 $\varepsilon$  : Galat

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar kulit daun lidah buaya (*A. vera*) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi ekstrak kasar kulit daun lidah buaya

(*A. vera*) terhadap bakteri *P. fluorescens*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak kasar kulit daun lidah buaya (*A. vera*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 5 perlakuan, sehingga terdapat 15 unit percobaan. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Penelitian Uji Cakram

Keterangan:

- A : Perlakuan konsentrasi 0% (kontrol)
- B : Perlakuan konsentrasi 5%
- C : Perlakuan konsentrasi 10%
- D : Perlakuan konsentrasi 15%
- E : Perlakuan konsentrasi 20%

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

- Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas dan diikat menggunakan benang.
- Air secukupnya dituang ke dalam *autoclave*, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara diagonal agar seimbang kekuatannya pada saat penutupan.

- Tombol ON dinyalakan, setelah mencapai suhu 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 *autoclave*
- Setelah alarm berbunyi maka pertanda sterilisasi berakhir dan temperatur diturunkan minimal. .
- *Autoclave* dimatikan pada posisi OFF, ditunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup *autoclave* dengan cara simetris.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.4.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Tempat dan laboran harus steril guna menghindari kontaminan. Tangan laboran yang bersinggungan, meja dan barang disekitar tempat perlakuan harus selalu dalam kondisi aseptis. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 70%, dengan cara fisika melalui pembakaran langsung maupun dengan penyinaran dengan sinar *ultra violet* (UV) selama 15 menit.

### 3.4.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Kulit Daun Lidah Buaya

Proses pembuatan ekstrak kasar kulit daun lidah buaya (Lampiran 4), dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Disiapkan lidah buaya (*A. vera*) segar yang diperoleh dari perkebunan bunga, kota Batu, Jawa Timur sebanyak 5 kg berat basah.
- Dikupas untuk memisahkan antara kulit daun dan daging (gel) lidah buaya.

- Kulit daun lidah buaya dikeringkan dengan cara diangin - anginkan. Berat awal kulit daun lidah buaya segar adalah 1,3 kg kemudian di keringkan dan dihasilkan berat kering sebesar 430 gram.
- Kulit daun lidah buaya yang sudah kering sebanyak 430 gram diblender hingga didapatkan serbuk kulit daun lidah dengan berat 415 gram.
- Ditimbang 100 gram untuk dimaserasi dengan 500 ml metanol pro analisis pada suhu kamar selama 72 jam.
- Disaring larutan maserasi kulitdaun lidahbuaya hingga diperoleh filtrat yang mengandung ekstrak.
- Filtrat yang diperoleh melalui penyaringan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 35° C dengan tujuan untuk memisahkan solven, sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 13,87 gram dan disimpan dalam botol sampel di dalam lemari pendingin.

Penyiapan ekstrak kasar kulit daun lidah buaya yang dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ariyanti *et al.* (2012), daun lidah buaya dikupas untuk memisahkan kulit daun lidah buaya dengan daging daun (gel), kemudian dikeringanginkan. Kulit daun lidah buaya dihaluskan dengan cara diblender dan ditimbang 100 gram untuk maserasi dengan 500 ml metanol pro analisis pada suhu kamar selama 72 jam. Perendaman serbuk kulit daun lidah buaya menggunakan pelarut metanol ini bertujuan agar senyawa antibakteri seperti saponin yang terkandung di dalamnya mudah larut dan diperoleh ekstrak yang mengandung senyawa tersebut. Pada penelitian Song *et al.* (2001) dalam Kristianingsih (2005), menggunakan metanol untuk ekstraksi *Aralia elata* karena saponin bersifat polar sehingga lebih mudah larut dan akan diperoleh lebih banyak ekstrak dari pada pelarut lain.

### 3.4.4 Pembuatan Media

#### A. PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens*, sehingga media yang digunakan yaitu PSA (*Pseudomonas Selective Agar*). Dosis yang digunakan dalam pembuatan PSA sebesar 25 gram/L. Langkah – langkah dalam pembuatan PSA sebagai berikut:

- Ditimbang PSA sebanyak 7 gram,
- PSA dilarutkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquades sebanyak 280 ml.
- PSA diaduk dengan menggunakan spatula hingga benar-benar larut secara homogen.
- Setelah larut sempurna, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas sampai rapat, lalu ditutup lagi dengan kertas alumunium foil dan dirapatkan dengan penali.
- Media yang sudah tertutup rapat, disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media ditunggu hingga hangat kuku lalu dituang ke dalam cawan petri dalam kondisi steril.
- Media ditunggu hingga mengeras dan siap untuk digunakan. Apabila media tidak langsung digunakan, maka media diberi label dan disimpan dalam lemari pendingin agar tidak terkontaminasi.

#### A. TSB (*Tryptic Soy Broth*)

TSB (*Tryptic Soy Broth*) merupakan media yang digunakan untuk kultur bakteri *P. fluorescens*. Langkah yang dilakukan dalam pembuatan media TSB yaitu:

- Ditimbang TSB sebanyak 0,6 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml.

- Ditambahkan aquades sebanyak 20 ml, diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kekuningan.
- Erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas hingga rapat lalu dibungkus dengan menggunakan kertas aluminium foil dan diikat dengan menggunakan benang kasur agar benar – benar tertutup rapat.
- Media disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah sterilisasi selesai, media dibiarkan dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

#### 3.4.5 Pemiakan Bakteri *P. fluorescens*

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens* yang didapat dari isolat murni berasal dari Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara. Isolat murni ini kemudian diremajakan pada media agar miring yaitu dengan menggunakan media TSA (*Tryptic Soy Agar*).

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali dengan metode gores menggunakan media cair yaitu TSB (*Tryptic Soy Broth*). Langkah yang dilakukan pada pembiakan bakteri *P. fluorescens* yaitu:

- Menyiapkan larutan media TSB yang telah dingin.
- Jarum osse dipanaskan di atas bunsen hingga berpijar untuk menghindari terjadinya kontaminasi.
- Setelah dingin, jarum osse disentuhkan pada biakan murni bakteri *P. fluorescens* dan dicelupkan pada media TSB yang sudah dingin.
- Media TSB dibiarkan selam 24 jam di dalam inkubator dengan suhu 30°C.
- Setelah 24 jam, media TSB akan berubah menjadi keruh yang menandakan bahwa bakteri telah tumbuh.

- Bakteri ini kemudian dilihat kepadatannya dengan Metode Mc. Farland dengan cara mencocokkan kekeruhannya berdasarkan kepadatan bakteri pada Mc. Farland. Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu  $10^7$  CFU/ml. Kepadatan bakteri  $10^7$  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, sehingga untuk mendapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml, maka diambil 1 ml bakteri dari media cair TSB dan diencerkan dengan menggunakan Nafis sebanyak 6 ml lalu didapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml. Menurut Savitri (2014), suspensi standar 0,5 Mc Farland adalah suspensi yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan bakteri sama dengan  $10^8$  CFU/ml. Maka suspensi bakteri dibuat terlebih dahulu kemudian disesuaikan kekeruhannya dengan 0,5 Mc Farland.
- Disiapkan petridisk yang sudah berisi media PSA.
- Bakteri dibiakkan dengan menyelupkan cotton swap pada bakteri yang sudah diencerkan.
- Digoreskan bakteri pada media agar pada cawan petri dengan metode gores supaya bakteri tidak terlalu menumpuk pada media agar pada cawan petri.
- Media PSA diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

Menurut Irianto (2005), teknik isolasi bakteri dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu secara goresan (*streaking*), atau secara sebar ulas (*spread plating*) pada media padat dalam cawan petri. Kedua cara tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan. Pada cara sebar ulas, kemungkinan memperoleh pathogen lebih besar karena sampel yang diambil dari hewan yang sakit atau air paling tidak sebanyak 1 gram atau 1 ml. Adapun secara goresan dilakukan hanya dengan menyentuhkan ujung *jarum osse*, jarum inokulasi atau *cotton bud* steril

pada bagian – bagian tertentu hewan yang diteliti (misalnya lembar insang, bagian luka atau borok, mucus atau *ascites*) selanjutnya digoreskan pada media.

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Uji Cakram

Uji cakram merupakan pengujian untuk antibakteri dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang mengandung bahan antibakteri sesuai dengan konsentrasi perlakuan (Pelczar dan Chan, 1986).

Prosedur pelaksanaan uji cakram adalah:

- Disiapkan cawan petri yang sudah terdapat media PSA sebanyak 20 ml.
- Disiapkan berbagai konsentrasi ekstrak kasar kulit daun lidah buaya yang akan diujikan untuk mengetahui daya hambatnya.
- Disiapkan bakteri pada media TSB dengan kepadatan  $10^8$  dan diencerkan dengan menggunakan Nafis untuk mendapatkan bakteri *P. fluorescens* dengan kepadatan  $10^7$ .
- Penanaman bakteri pada media PSA dilakukan dengan mencelupkan cotton swap pada bakteri yang sudah diencerkan ke Nafis.
- Bakteri digoreskan pada media PSA dengan metode zig-zag. Penanaman bakteri ini dilakukan pada *Laminar Air Flow* dengan kondisi yang tetap steril agar tidak terkontaminasi.
- Merendam kertas cakram pada masing – masing konsentrasi yang ditentukan selama 15 menit.
- Kertas cakram ditiriskan dan diletakkan pada lempeng agar yang sebelumnya sudah ditanami bakteri.
- Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu ruang yaitu  $30^{\circ}\text{C}$ .

- Diukur diameter zona bening yang ada disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong untuk menentukan konsentrasi optimum yang dapat menghambat bakteri.
- Untuk mengetahui sifat bakteriosidal (membunuh bakteri) maka dilakukan pengamatan setelah 48 jam.

### 3.6 Parameter Uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu diameter daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dengan mm ditambah daerah bening yang ada di sekeliling kertas cakram. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi yakni sebesar 37° C dan lama waktu perendaman kertas cakram pada perlakuan konsentrasi ekstrak yang berbeda..

### 3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan.