

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk Rusip.

2. Sampel

Sampel yang digunakan yaitu produk Rusip yang difermentasi dari bulan Februari hingga Maret.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah Rusip.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari senyawa yang terdapat dalam Rusip terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah produk Rusip dalam berbagai konsentrasi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yang dapat dilihat dari pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media uji.

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian ini.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, Rusip adalah suatu produk fermentasi ikan teri yang mengandung kelompok bakteri asam laktat (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Enterococcus*). Bahan-bahan pada produk Rusip terdiri dari bakteri, ikan teri, garam dan gula aren. Kandungan gizi di dalam

produk Rusip adalah lemak, protein, asam amino dan asam lemak. Produk ini diproduksi di Sukoharjo.

Kedua, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketiga, Senyawa antibakteri adalah senyawa yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Keempat, Potensi antibakteri adalah kemampuan BAL yang dihasilkan dari produk Rusip dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan menunjukkan diameter zona hambat yang lebih besar daripada diameter zona hambat kontrol negatif.

Kelima, metode difusi adalah metode untuk uji aktivitas antibakteri. Metode difusi menggunakan media MHA dalam cawan petri yang mempunyai diameter dan ketebalan media tertentu. Suspensi bakteri uji diinokulasikan pada media MHA. Media yang telah berisi biakan bakteri tersebut dituangkan kedalam cawan Petri dan diratakan lalu dibiarkan memadat. Kemudian dibuat sumuran pada permukaan media. Supernatan rusip dimasukkan kedalam sumuran, serta kontrol negatif aquadest dan kontrol positif Kloramfenikol, lalu mengamati diameter zona hambat.

Keenam, metode dilusi adalah metode untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroba. Senyawa antimikroba yang diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi mikroba uji dalam media cair yang kemudian diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *shaker*, *rotary evaporator*, Bunsen, kasa, corong kaca, cawan Petri, penangas air, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, corong pisah, inkas, jarum Ose, kapas steril, spidol, batang pengaduk, autoklaf, inkobator, Beaker blass, pipet ukur, kaca objek, *deckglass* dan mikroskop.

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk rusip, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, aquadest, larutan standart Mc Farland 0,5.

Media agar yang digunakan pada penelitian ini adalah *deMan Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Endo Agar* (EA), *Nutrient agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), *Simmon Citrole Agar* (SCA).

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi alat

Proses sterilisasi mengacu pada Jawetz *et al.* (2012) yaitu media disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Alat-alat dari kaca disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara mencuci alat-alat yang di perlukan dengan menggunakan detergen selama 15 -30 menit. Alat-alat dikeringkan dengan posisi terbalik di udara terbuka. Setelah kering dibungkus dengan kertas perkamen. Tabung reaksi dan gelas Erlenmeyer terlebih dahulu disumbat dengan kapas bersih.

2. Pembuatan Rusip

Pembuatan rusip dilakukan berdasarkan Koesoemawardani *et al.* (2011). Ikan teri segar dicuci dan dibersihkan kemudian ditiriskan untuk menghilangkan

air yang mungkin masih tersisa. Setelah itu ikan teri yang telah bersih ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan kedalam wadah atau toples. Kemudian dilakukan penambahan garam sebanyak 25% (b/b) dari berat ikan (25 gram) dan diaduk sampai rata. Setelah garam diaduk rata, ditambahkan gula aren sebanyak 10% (b/b) dari berat ikan (10 gram) dicampurkan dan diaduk sampai rata. Kemudian diinkubasi selama 7 hari.

3. Isolasi Bakteri dalam produk Rusip

Isolasi BAL dilakukan dengan mengacu pada penelitian Yolanda dan Meitiniarti (2017). Isolasi BAL dilakukan dengan metode *streak plate*. Rusip ditimbang secara aseptis sebanyak 10 gram kemudian diblender dan disaring. Masing-masing satu Ose diinokulasikan ke dalam media MRSA pada cawan Petri secara goresan. Tahap selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kemudian di amati koloni yang terbentuk.

4. Identifikasi Bakteri dari dalam produk Rusip

3.1 Pengamatan Morfologi Koloni. Pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi dan warna koloni pada media MRSA. Koloni yang diduga BAL memiliki morfologi warna putih, bulat dan tepian jelas serta terdapat zona bening (Yolanda dan Meitiniarti 2017).

3.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri isolat dari produk rusip diulaskan diatas objek gelas dan difiksasi di atas api. Pulasan tersebut kemudian ditetesi dengan Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan air mengalir kemudian tetesi dengan mordant (Gram B), diamkan kurang lebih 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C (etanol) lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan Gram D (safranin) diamkan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak emersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskopis dengan pembesaran 10x100 kali. Pada pengamatan sifat Gram, apabila warna sel adalah violet, menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk bakteri Gram positif.

Namun, bila warna merah yang terjadi berarti bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif (Yolanda dan Meitiniarti 2017).

3.3 Pengecatan *acid fast*. Pengecatan *acid fast* termasuk pengecatan diferensial karena dapat membedakan bakteri-bakteri yang *acid fast* (tahan terhadap pencucian asam) dan yang *non acid fast* (tidak tahan terhadap pencucian asam). Buat pulasan isolat bakteri dari produk rusip di atas objek gelas dan memfiksasinya di atas api. Selanjutnya larutan *carbolfuchsin* ditambahkan di atasnya. Setelah itu, didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan diangin-anginkan. Cuci dengan alkohol 96% sambil digoyangkan sampai seluruhnya tidak tampak. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan diangin-anginkan. *Methylene blue* diteteskan di atas objek gelas dan didiamkan selama 20-30 detik. Tahap selanjutnya dicuci, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat sampai 1000X menggunakan minyak emersi. Bakteri yang bersifat *acid fast* tampak berwarna merah, sedangkan yang *non acid fast* berwarna biru (Yolanda dan Meitiniarti 2017).

3.4 Uji Katalase. Uji ini digunakan untuk mengetahui apakah bakteri mempunyai enzim katalase atau tidak. Enzim katalase dapat mereduksi H_2O_2 dan O_2 . Uji katalase dilakukan dengan menambah 1 tetes pereaksi H_2O_2 pada tabung reaksi yang berisi medium NB (*Nutrien Broth*) yang telah diinokulasi dengan bakteri ditunggu beberapa detik sampai terbentuknya gelembung gas. Uji ini akan bersifat positif bila terbentuk gelembung gas O_2 dan bakteri bersifat negatif apabila bakteri tidak dapat menghasilkan enzim katalase yang mampu mengkatalis penguraian H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 pada medium yang mengandung bakteri tersebut setelah didiamkan beberapa detik (Jawetz *et al.* 2007).

5. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji diambil dari biakan murni kurang lebih 2 Ose dan ditanam pada media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri kemudian diencerkan dengan BHI sampai didapatkan kekeruhan yang disamakan dengan *McFarland* 0,5 (Bonang dan Koeswardono 1982).

6. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

5.1 Identifikasi makroskopis pada medium diferensial. Suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* digoreskan pada media *Vogel Johnson Agar* (VGA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium tellurit 1% dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium berubah menjadi kuning (Jawetz *et al.* 2007).

5.2 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Staphylococcus aureus*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas yang difiksasi kemudian tetesi dengan Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan air mengalir kemudian tetesi dengan mordant (Gram B), diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C (etanol) lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan Gram D (safranin) diamkan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak emersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskopis dengan pembesaran 10x100 kali. Gram positif didapatkan apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur berarti bakteri positif golongan *Staphylococcus aureus* (Jawetz *et al.* 2007).

5.3 Identifikasi mikroskopis dengan uji biokimia. Identifikasi secara biokimia ada dua macam yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji dengan penambahan 2 tetes hydrogen peroksida 3% (H_2O_2). Hydrogen peroksida 3% yang ditumbuh bakteri akan terurai menjadi H_2O dan O_2 . Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk gelembung-gelembung udara, hal tersebut disebabkan *Staphylococcus aureus* mempunyai enzim katalase (Jawetz *et al.* 2007). Uji koagulase menggunakan plasma darah manusia sebanyak 0,3 ml kemudian ditambah 0,1 ml kultur atau suspensi bakteri pada media BHI dan diinokulasi pada suhu 37°C. diamati adanya penggumpalan setelah 4-6 jam

atau lebih. Hasil dinyatakan positif kuat jika tabung tes dibalik gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al.* 2007).

7. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

7.1 Identifikasi makroskopis pada medium diferensial. Suspensi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasi pada media diferensial *Endo Agar* (EA) dan diinokulasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif dikatakan bila penampakan koloni merah dengan kilat logam yang permanen dan warna medium merah violet (Jawetz *et al.* 2007).

7.2 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas yang difiksasi kemudian tetesi dengan Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan air mengalir kemudian tetesi dengan mordant (Gram B), diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C (etanol) lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan Gram D (safranin) diamkan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak emersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskopis dengan pembesaran 10x100 kali. Gram negatif didapatkan bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli berarti positif golongan *Escherichia coli* (Jawetz *et al.* 2007).

7.3 Identifikasi fisiologis dengan uji biokimia. Pertama uji biokimia SIM (*Sulfide Indol Motility*). Biakan bakteri ditusuk pada media SIM kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Uji sulfide positif bila medium berwarna hitam, uji indol positif bila berbentuk warna merah setelah pertumbuhan reagen erlich, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media (Jawetz *et al.* 2007).

Kedua uji KIA (*Kliger's Iron Agar*). Pengujian media KIA dilakukan pengamatan pada bagian lereng, dasar, ada tidaknya gas dan terbentuk warna hitam. Biakan bakteri dirusuk dan digores lalu inkubasi selama 18-24 jam pada

suhu 37°C. amati adanya warna kuning pada bagian lereng dan pada pada bagian dasar, perubahan adanya media yang pecah atau terangkat ke atas menunjukkan adanya gas, warna media yang tidak berubah warna hitam menunjukkan uji sulfide negatif (Jawetz *et al.* 2007).

Ketiga uji LIA (*Lysin Iron Agar*). Pengujian media LIA dilakukan pengamatan pada bagian media LIA yang akan diamati dengan cara inokulasi tusuk dan digores, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. diamati adanya perubahan warna merah coklat ungu, atau kuning pada bagian lereng dan dasar media LIA. Perubahan warna hitam pada media LIA menunjukkan uji sulfida positif (Jawetz *et al.* 2007).

Keempat uji sitrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan pada permukaan media kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Uji positif bila media berwarna biru (Jawetz *et al.* 2007).

8. Pengujian Potensi Antibakteri dari BAL produk Rusip

8.1 Pembuatan supernatan BAL produk rusip. Isolat BAL produk rusip yang sudah diidentifikasi diambil 1 Ose lalu diinokulasikan dalam 10 mL MRSB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur BAL kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 25°C selama 15 menit. Supernatan diambil untuk dilakukan pengujian antibakteri (Setianingsih 2010).

8.2 Pembiakan bakteri uji secara *Streak plate*. Suspensi bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922 yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C diinokulasikan dengan kapas lidi steril pada media MHA yang sudah memadat. Media yang telah berisi biakan bakteri dibiarkan berdifusi selama 30 menit (Batubara 2018).

7.3 Pengujian potensi antibakteri menggunakan metode difusi sumur agar. Pengujian potensi antibakteri dengan metode difusi sumur agar mengacu pada penelitian Gaamouche *et al.* (2014). Media MHA berisi biakan bakteri uji yang sudah padat dibuat lubang-lubang sumur dengan diameter 7 mm menggunakan *boor prop*. Ekstrak kasar BAL selanjutnya dibuat 3 variasi konsentrasi yaitu 200 ppm, 400 ppm dan 800 ppm dengan menggunakan pengencer media MRSB (Delves 1993). Masing-masing konsentrasi diambil

sebanyak 50 μL lalu dimasukkan pada lubang sumur. Sebagai kontrol positif, salah satu sumur diisi dengan antibiotik kloramfenikol. Sebagai kontrol negatif diisi dengan aquadest steril. Cawan Petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona jernih yang terbentuk di sekitar sumur diukur dengan menggunakan penggaris (Gaamouche *et al.* 2014).

7.4 Pengujian potensi antibakteri dengan metode dilusi. Pengujian potensi antibakteri dengan metode dilusi mengacu pada penelitian Nuraina (2015). Metode dilusi dilakukan dengan menyiapkan 9 tabung steril. Masing-masing tabung reaksi berisi supernatan BAL produk rusip. Konsentrasi yang digunakan mulai dari 800 ppm sampai 12.5 ppm. Tahap selanjutnya, masing-masing tabung diisi dengan 1 mL media MRSB. Setelah itu, ditambahkan 1 mL larutan stok pada tabung reaksi pertama *divortex* (kecepatan 250 rpm). Dari tabung pertama diambil 1 mL lalu dipindahkan ke dalam tabung kedua dan seterusnya sampai konsentrasi 12.5 ppm. Setelah itu, diambil 1 mL larutan pada tabung terakhir dan dibuang, sehingga masing-masing tabung berisi 1 mL. Tahap berikutnya, masing-masing tabung ditambah 0,1 mL suspensi bakteri uji. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam lalu diamati kekeruhannya dan dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. Kontrol negatif berisi supernatan BAL dan kontrol positif berisi suspensi bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923. Konsentrasi paling rendah yang menunjukkan kejernihan adalah KHM.

Untuk mengetahui KBM, dilakukan dengan menginokulasikan tabung yang menunjukkan kejernihan secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri. Tahap selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media padat. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

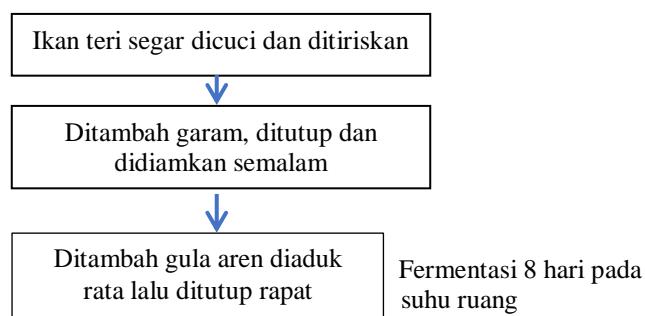
E. Analisi Data

Hasil penelitian uji aktivitas antibakteri dari BAL produk rusip terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922 dianalisis berdasarkan nilai zona hambat yang terbentuk menggunakan metode difusi. Analisis hasil yang

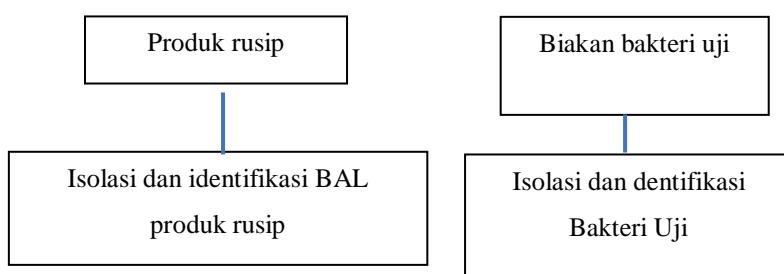
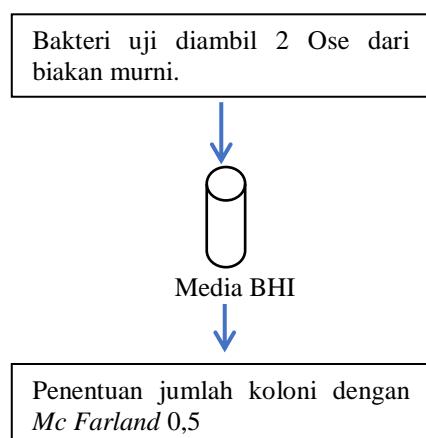
digunakan secara dilusi adalah dengan membandingkan hasil Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak rusip terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922. Hasil data yang diperoleh dilakukan analisa dengan menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnov* untuk mengetahui normalitas data, sedangkan kehomogenan varian diuji dengan uji *Levene*. Apabila $P>0,05$, maka data terdistribusi normal dan homogen untuk setiap varian dan dilanjutkan dengan uji parameterik *One Way* atau *Two Way Anova*. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila data terdistribusi tidak normal, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan jika perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS statistik 17.

F. Skema Jalannya Penelitian

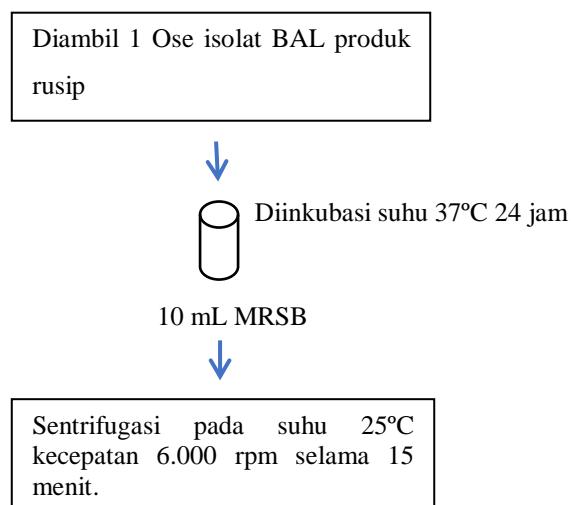
Pembuatan rusip



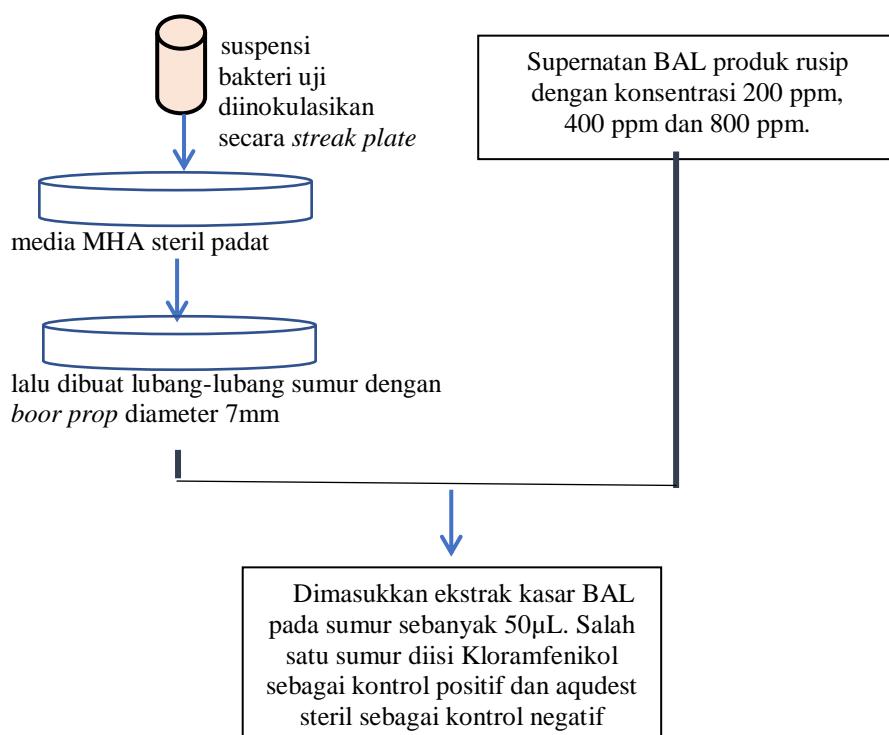
Pembuatan suspensi bakteri uji

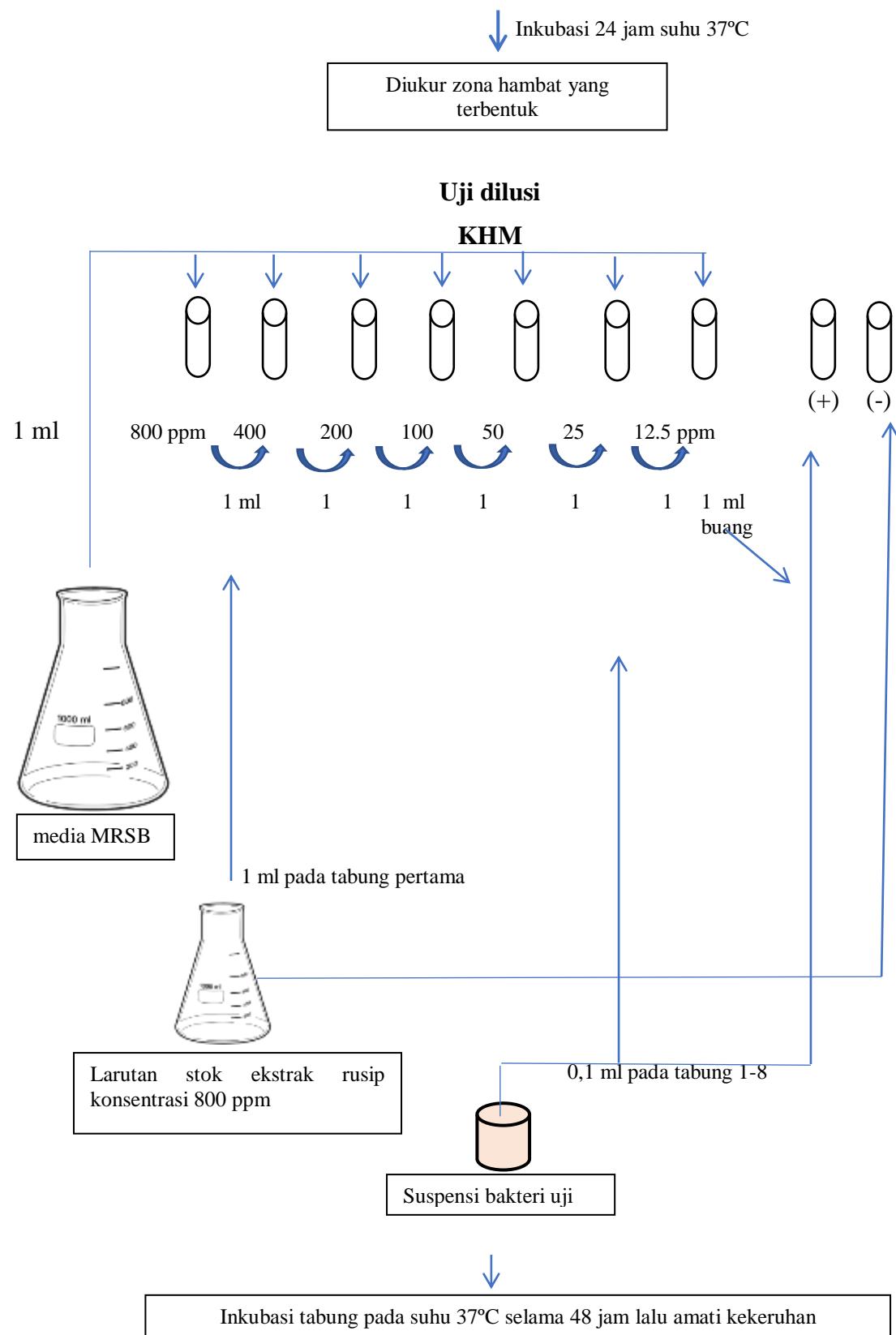


Pembuatan supernatan BAL produk rusip



Uji difusi





KBM

Tabung yang jernih diinokulasi pada media selektif dalam cawan petri, inkubasi pada 37°C selama 24 jam lalu diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri