

VI. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Pebruari sampai April 1996, dilaboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan

Usnea spp, biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*, Nutrien agar, Nutrien cair, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , CH_3COOH , Aquadest, Alkohol teknis, cat gram.

2. Alat

Autoklaf, corong, cylinder disk (diameter 1 cm), batang pengaduk, erlenmeyer, gelas piala, inkubator, jarum ose, mortir dan penggerus, mikropipet 0,2 ml, pipet ukur 1 ml, pipet, mikroskop, oven, pembakar spiritus, pinset, cawan petri, scalpel, pH meter, tabung reaksi dan rak, tabung reaksi, timbangan elektrik, soxhlet, penangas, kompor, hot plate stirer, vacuum pump, rotary evaporator.

C. Cara Kerja

1. Pengambilan Sampel

Sampel *Usnea spp* didapatkan dari hutan wisata Kopeng, Magelang, dibawa dalam keadaan segar, kemudian ditempatkan dalam panci dangkal dan dibasahi dengan air agar proses fisiologi tetap aktif. Selanjutnya ditempatkan pada tempat yang langsung terkena sinar matahari.

2. Persiapan Alat dan bahan

Tahap persiapan meliputi, pencucian alat, pembuatan medium dan sterilisasi. Untuk alat seperti pipet dan cawan petri disterilkan dengan oven, sedang medium dan cylinder disk disterilkan dengan autoklaf.

Medium yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Medium Nutrien Agar dan Medium Nutrien Cair.

1. Cara Pembuatan Medium

- Medium Nutrien Agar dibuat dengan menimbang Nutrien Agar (NA) seberat 28 gr dilarutkan dalam 1000 ml aquadest dengan cara dididihkan dalam "Hot Plate Stirer"
- Sedang Medium Nutrien Cair dibuat dengan melarutkan 4 gr Nutrien Broth dalam 500 ml aquadest
- Medium Nutrien Agar dan Medium Nutrien Cair

yang telah dibuat tersebut disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit (Hadisutomo, 1993).

3. Pembuatan Suspensi Bakteri

- Biakan bakteri ditanam ke dalam agar miring dan dinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Diambil sedikit biakan di atas dan di inokulasikan ke dalam medium Nutiren Cair, dinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian dilakukan pengujian dengan pengecatan gram.
- Dari biakan dalam medium cair di atas dibuat pengenceran dari 10¹- 10⁵, setelah masa inkubasi 24 jam dipilih pengenceran biakan bakteri yang menunjukkan Transmisi 25 % jika diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 580nm. Selanjutnya suspensi ini dijadikan suspensi yang akan diujikan terhadap ekstrak *Usnea spp.* (Anonim, 1989).

4. Pembuatan Ekstrak

4.1. Cara ekstraksi

- Bahan (*Usnea spp.*) dikumpul kandari lapangan, dicuci (dibersihkan dari kotoran yang tercakpur) kemudian ditiriskan
- Dengan menggunakan pisau atau gunting bahan yang sudah kering dipotong-potong sekecil

mungkin, kemudian dibungkus dengan kertas saring dan diikat dengan benang.

- Dimasukan ke dalam alat pengestrak (soxhlet) yang telah disiapkan, dengan menggunakan pelarut Ethyl alkohol (Etanol). Ekstraksi dihentikan setelah bahan terekstrak sempurna (terlihat dengan warna bening pada pelarut yang mengenai bahan (*Usnea spp*)).
- Filtrat atau hasil ekstraksi disaring selanjutnya diuapkan dengan alat rotary evaporator (Rotavapor) sampai volume kira-kira tinggal 5 - 10 ml, kemudian dipindahkan ke erlenmeyer dan dibiarkan sampai kering betul (Burkholder, Evans and Meivieg, 1944).

4.2. Pembuatan Larutan Ekstrak

- Dengan menggunakan mortir dan penggerus hasil ekstrak dilembutkan/dihaluskan.
- Kemudian ditimbang 100 mg dan dilarutkan dalam 1 ml pelarut buffer fosfat pH 7,4 sehingga didapatkan konsentrasi 100 % (w/v)
- Untuk membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 75 % , 50 % dan 25 % dengan menimbang hasil ekstrak seberat 75 mg, 50 mg, 25 mg yang masing-masing dilarutkan dalam

pelarut buffer fosfat pH 7,4 1 ml.

- Buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan mencampurkan 80,8 ml Na_2HPO_4 1/15 M dan 19,2 ml KH_2PO_4 1/15 M sehingga didapatkan pelarut buffer fosfat sebanyak 100 ml (Burkholder and Evans, 1945).

4. Pengujian Ekstrak Terhadap Bakteri Uji

Untuk mengetahui zona hambatan yang dihasilkan ekstrak *Usnea spp* terhadap baktri uji digunakan metode Cylinder-plate yaitu :

- Ditanam 1 ml kultur bakteri uji (Transmisi 25%) dengan cara tuang pada cawan petri, kemudian diratakan.
- Ditambahkan Medium Nutrien Agar 15 ml ke dalam cawan petri yang berisi biakan bakteri di atas dan dibiarkan memadat.
- Diletakkan 3 cylinder disk steril berdiameter 1 cm pada cawan petri yang berisi agar dan biakan bakteri di atas.
- Tiap cylinder disk disisi dengan pipet 0,2 ml ekstrak bahan yang telah dibuat (untuk tiap cawan petri, digunakan satu macam kadar/konsentrasi).
- Disamping itu dilakukan pula pengujian dengan larutan buffer fosfat dan aquadest steril sebagai kontrol.

- Diinkubasikan selama 24 jam sampai 72 jam pada suhu 37°C.
- Dilakukan pengamatan kepekaan dengan mengukur diameter daerah hambat (DDH) yang terbentuk dari masing-masing perlakuan (Umbreit, 1960; Florey *et al*, 1959).

D. Rancangan Percobaan

Percobaan menggunakan pola faktorial 4 x 4 dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Kombinasi perlakuan sebanyak 16 perlakuan diulang 3 kali.

Kombinasi perlakuan yang ada adalah :

Jenis Bakteri	konsentrasi					
	K1	K2	K3	K4	K5	K6
B1	B1K1	B1K2	B1K3	B1K4	B1K5	B1K6
B2	B2K1	B2K2	B2K3	B2K4	B2K5	B2K6
B3	B3K1	B3K2	B3K3	B3K4	B3K5	B3K6
B4	B4K1	B4K2	B4K3	B4K4	B4K5	B4K6

Keterangan :

B1 : <i>B. subtilis</i>	K1 : Kadar ekstrak 100 % (w/v)
B2 : <i>S. aureus</i>	K2 : Kadar ekstrak 75 % (w/v)
B3 : <i>Ps. aeruginosa</i>	K3 : Kadar ekstrak 50 % (w/v)
B4 : <i>E. coli</i>	K4 : Kadar ekstrak 25 % (w/v)
	K5 : Kadar ekstrak 0 % (w/v)
	K6 : Aquadest