

BAB IV. METODOLOGI

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

Waktu penelitian dari bulan Mei sampai September 1997.

B. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan :

Autoklaf, tabung reaksi dan rak tabung, timbangan analitik, timbangan elektrik Sartorius, gelas ukur, gelas piala, pipet tetes, pipet ukur, cawan petri, lampu spiritus, jarum ose, inkubator, oven, erlenmeyer, rotary evaporator, kertas pH, pinset, corong, mikroskop, gelas benda dan penutupnya, cakram kertas berdiameter 1 cm, blender, colony counter, perkolator dan spektrofotometer (Spektronic 20).

2. Bahan Yang digunakan :

Metanol, medium Nutrien Agar, medium Nutrien Broth, larutan Garam fisiologis (NaCl 0,85%(w/v)), aquadest, alkohol 70%, minyak imersi, xylol, Gram A (kristal violet), Gram B (larutan iodine), Gram C (alkohol), Gram D (safranin), Jamur merang (*Volvariella volvacea*) dari Ajibarang-Banyumas, biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophila* (dari BPPAT/ Balai Penelitian Perikanan Air Tawar- Bogor) dan *Pseudomonas fluorescens* (dari PAU-UGM).

C. Cara Kerja

1. Persiapan Alat dan Bahan

Tahap persiapan meliputi pencucian alat, pembuatan medium dan sterilisasi. Untuk alat-alat seperti pipet, cakram kertas (*paper disk*) dan cawan petri disterilkan dengan oven, sedangkan medium disterilkan dengan autoklaf.

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium NA (Nutrien Agar) dan NB (Nutrien Broth).

2. Cara Pembuatan Medium :

- Medium NA dibuat dengan menimbang NA (Difco) seberat 28 gram dilarutkan dalam 1000 ml aquadest dengan cara dididihkan dalam *hot plate stirer*.
- Medium NB dibuat dengan melarutkan 8 gram NB (Difco) dalam 1000 ml aquadest.
- Medium-medium yang telah dibuat tersebut kemudian disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit (Hadisutomo, 1993).

3. Pembuatan Suspensi Bakteri :

- Biakan bakteri ditanam kedalam agar miring dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Diambil satu ose biakan diatas dan diinokulasikan kedalam medium NB, kemudian diinkubasikan selama 24 jam.
- Dari biakan dalam medium NB di atas diencerkan sampai diperoleh T 50% dengan λ 620 nm pada Spektronic 20, dengan kerapatan sel 10^7 - 10^8 sel/ml untuk *Aeromonas hydrophila* dan T 45% untuk *Pseudomonas fluorescens* .

- Suspensi ini merupakan suspensi yang akan diujikan terhadap ekstrak *Volvariella volvacea*.

4. Pembuatan Ekstrak

4.1. Cara Ekstraksi senyawa glikosida dari jamur merang

Cara ekstraksi menurut Markham (1988) adalah sebagai berikut :

- Jamur merang dari stadium : kancing, telur, perpanjangan dan dewasa masing-masing dikelompokkan dan dipotong kecil-kecil, selanjutnya dikeringkan dibawah sinar matahari lalu dihancurkan dengan blender sampai berbentuk serbuk.
- Serbuk jamur merang dari masing-masing stadium dimasukkan ke dalam perkolator yang bagian dasarnya dilapisi kapas dan kertas saring, kemudian dilakukan ekstraksi melalui dua tahap ; tahap I menggunakan pelarut metanol dan aquadest dengan perbandingan 9 : 1, dan tahap II dengan perbandingan 1 : 1.
- Pada setiap tahap dibiarkan selama 24 jam, setelah itu perkolat diturunkan melalui kran perkolator. Hal tersebut diulang 2-3 kali atau sampai warna perkolat sudah agak jernih.
- Hasil ekstraksi dari dua tahap diatas, disatukan dan diuapkan dalam rotary evaporator sampai volumenya menjadi sepertiga volume asal atau sampai semua metanol menguap.

4.2. Pembuatan larutan ekstrak

Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi larutan ekstrak sesuai dengan yang telah dilakukan oleh Sri

Lestari (1995), yaitu satu gram serbuk jamur merang dalam 8 ml aquadest (12,5% w/v), dengan cara :

- Disetarakan berat ekstrak yang terbentuk dengan berat serbuk jamur merang yang diekstraksi. Misalnya dalam penelitian ini setiap satu gram serbuk jamur merang dari stadium dewasa menghasilkan ekstrak seberat 0,16 gram, maka setiap 0,16 gram ekstrak ditambah dengan 8 ml aquadest (Tabel 08).
- Ekstrak yang telah dilarutkan dalam aquadest disterilkan pada suhu 100^oC selama 30 menit (diulang tiga kali).

5. Pengujian ekstrak terhadap bakteri uji

Untuk mengetahui daya hambat yang dihasilkan ekstrak jamur merang terhadap bakteri uji digunakan metode *paper-disk*, yaitu:

- Ditanam 1ml kultur bakteri uji ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan 15 ml NA, diratakan dan dibiarkan memadat.
- *Paper disk* steril berdiameter 1 cm yang telah dicelupkan ke dalam larutan ekstrak jamur merang (12,5%) dalam aquades, diletakkan diatas permukaan media lempeng agar yang berisi biakan bakteri diatas. Pada masing-masing cawan petri diletakkan tiga *paper disk* yang berisi ekstrak jamur merang pada stadium yang sama.
- Disamping itu dilakukan pula pengujian dengan aquadest steril (tanpa ekstrak) sebagai kontrol.
- Diinkubasikan selama 24-48 jam pada suhu 29-30^oC.
- Dilakukan pengukuran diameter daerah hambatan yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

D. Parameter-Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati adalah Diameter Daerah Hambatan (DDH) yang terbentuk dari masing-masing *paper disk* dalam satuan milimeter (mm), yang diukur dengan jangka sorong.

Sebagai parameter penunjang dalam penelitian ini adalah pengukuran medium pengujian (NA dan NB) dengan kertas pH dan pengukuran suhu inkubasi dengan Termometer pada inkubator.

E. Rancangan Percobaan

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktor Tunggal dengan empat perlakuan pada dua bakteri uji, masing-masing perlakuan diulang tiga kali .

Jenis bakteri	Stadium jamur merang			
	S1	S2	S3	S4
B1	B1S1	B1S2	B1S3	B1S4
B2	B2S1	B2S2	B2S3	B2S4

Keterangan :

B1 : *Aeromonas hydrophila*

B2 : *Pseudomonas fluorescens*

S1 : Stadium Kancing

S3 : Stadium Perpanjangan

S2 : Stadium Telur

S4 : Stadium Dewasa

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis Sidik Ragam (ANOVA). Jika berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan.