

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Berdasarkan tujuannya, penelitian ini termasuk penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri yoghurt daun kelor dan lidah buaya terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Tahap penelitian meliputi: tahap determinasi tumbuhan, preparasi lidah buaya, pembuatan simplisia daun kelor, fermentasi, peremajaan bakteri *Escherichia coli*, pembuatan suspensi bakteri, uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah yoghurt daun kelor dan lidah buaya.

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah yoghurt daun kelor dan lidah buaya dengan volume 1 mL.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan mulai penyusunan proposal sampai terlesainya karya tulis ilmiah ini yaitu pada bulan Februari–Mei 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Adapun variabel yang akan diamati adalah sebagai berikut:

Tabel 3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Yoghurt daun kelor dan lidah buaya	Hasil fermentasi Susu dengan penambahan daun kelor dan lidah buaya	Mikropipet	mL	Nominal
Aktivitas antibakteri yoghurt daun kelor dan lidah buaya	Kemampuandalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia Coli</i>	Jangka sorong	Zona bening disekitar lubang sumuran	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah Glasswere (pyrex), Timbangan analitik (Ohaus), Api bunsen, kawat ose, Blutip, Mikro pipet, Inkubator (Mement), Oven (Mement), Autoclaf (Allamericant no serial 10018974), Batang pengaduk, Jangka sorong, Cawan petri, Tabung reaksi, Bola hisap.

3.5.2 Bahan

Ada pun bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun Kelor kelor, Lidah Buaya kultur campuran (*lactobacillus bulgaricus* dan *streptococcus thermophilus*), susu, larutan NaCl 0,9%, media EMBA, MHA.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Prosedur Ekstraksi Lidah Buaya Dengan Cara Perebusan (Infundasi)

Diambil lidah buaya, kemudian dibersihkan dari kotoran dengan menggunakan air mengalir atau biasa disebut sortasi basah kemudian ditiriskan. Dipisahkan antara daging dan kulitnya. Ditimbang daging lidah buaya sebanyak 125 gram. Diblender hingga halus semua daging lidah buaya. Didiamkan hingga busanya menghilang kemudian dibuat infusa dengan ditambahkan air sebanyak 250 mL dilakukan perebusan selama 15 menit terhitung saat suhu telah mencapai 90°C dengan sesekali diaduk. Infusa yang diperoleh kemudian disaring dengan kain flanel. (Adriyan dan Aminah, 2012).

3.6.2 Prosedur Estraksi Daun Kelor Dengan Cara Perebusan (Infundasi)

Ditimbang daun kelor segar yang akan digunakan sebanyak 125 gram kemudian dibuat infusa dengan ditambahkan air sebanyak 250 mL dilakukan perebusan selama 15 menit terhitung saat suhu telah mencapai 90°C dengan sesekali diaduk. Infusa yang diperoleh kemudian disaring dengan kain flanel (Yuliani dan Dienina, 2015)

3.6.3 Pembuatan yoghurt Daun Kelor dan Lidah Buaya

Disiapkan bahan baku susu murni dipasteurisasi selama 30 menit pada suhu 60°C (mengg unakan thermometer). Hal ini bertujuan untuk menghilangkan bakteri lain yang hidup dalam susu agar tidak mengganggu pertumbuhan bakteri asam laktat. Kemudian dibiarkan susu hingga suhu turun agar bakteri asam laktat dapat berkembang biak dengan baik, selanjutnya dimasukkan starter *Lactobacillus bulgaricis* dan *Streptococcus thermophiles* kedalam susu dan dicampurkan ekstrak kelor dan gel lidah buaya, gula dan essence melon, 37°C selama 20-24 jam dalam keadaan tertutup rapat. Setelah diinkubasi *yoghurt* pada suhu 20-24 jam dalam keadaan tertutup rapat. Setelah diinkubasi, dikeluarkan dari incubator dan disimpan dalam pendingin (Fatmawati dkk.,2013)

1.6.4 Formula

Tabel formula 3.6 formula pembuatan yoghurt daun kelor dan lidah buaya

Formula	mL/ gram
Infusa daun kelor	25%
Infusa lidah buaya	25%
Starter <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>streptococcus thermophilus</i>	5%
Susu	add 100 mL

3.6.6 Tahap pengujian Aktivitas Antibakteri

3.6.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan bahan dalam penelitian disterilkan terlebih dahulu dengan tujuan agar peralatan yang digunakan tidak terkontaminasi oleh mikroba atau bakteri yang diinginkan sterilisasi yang dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.6.6.2 Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

Menyiapkan tabung reaksi steril dan kawat ose, kemudian menuangkan media peremajaan dilakukan dengan media mirirng EMBA, ditanamkan bakteri *Escherichia coli* melalui goresan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri

Masing-masing bakteri yang telah dibiakan secara murni pada media EMBA yang telah disiapkan pada prosedur sebelumnya dalam suasana aerob. Diambil sebanyak 1-2 ose biakan murni bakteri uji yang telah dikultur, disuspensikan dengan menggunakan larutan NaCl 0,9% 10 ml sampai diperoleh kekeruhan sesuai standar 0,5 *Mc Farland* atau sebanding dengan jumlah bakteri 1×10^8 CFU/ml dan menggunakan panjang gelombang 580 nm (NCCLS, 2003). Kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan kedalam media agar penana

3.6.6.4 Preparasi Sampel Yoghurt

Yoghurt disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm, supernatant diambil untuk menguji pada aktivitas antibakteri.

3.6.6.5 Uji Aktivitas Yoghurt

Diambil suspensi bakteri sebanyak 1 mL, selanjutnya media MHA dituangkan kedalam cawan petri, dibiarkan sampai memadat, kemudian dibuat lubang sumuran, dimasukkan sampel yoghurt daun kelor dan lidah buaya pada lubang sumuran sebanyak 1 mL, kemudiandiinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, diamati daerah bening yang menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri kemudian diukur diameternya.

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini analisis data yang dilakukan adalah dengan mengukur zona bening yang terdapat pada sekitar lubang sumuran.

Tabel 3.7 Kekuatan Diameter Zona Bening

Kekuatan daya antibakteri	Zona hambat
>20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah