BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah eksperimen. Menurut (Jaedun, 2011), penelitian eksperimen merupakan penelitian untuk menentukan pengaruh variabel perlakuan (independent variable) terhadap variabel dampak (dependent variable).

3.2 Desain Penelitian

Desain penelitian yang diterapkan untuk metode eksperimen adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana setiap perlakuan dalam percobaan dirancang dalam kondisi yang relatif homogen (Mattjik dan Sumertajaya, 2000). Adapun prosedur penelitian dengan metode eksperimen meliputi *Disc Diffusion Assay* (DDA), MIC, MBC, dan aplikasi sebagai *food sanitizer*. Pemberian perlakuan pada tahapan ini dilakukan dua kali pengulangan sesuai dengan rumus (Federer, 1977)

- DDA

  $\{(p-1)\ (n-1) \geq 15\}$

  $\{(24-1)\ (n-1) \geq 15\}$

  $\{23\ (n-1) \geq 15\}$

  $23n-23 \geq 15$

  $23n \geq 15+23$

  $23n \geq 38$

  $n \geq 1{,}65 \sim 2$

- MIC dan MBC

  $\{(p-1)\ (n-1) \geq 15\}$

  $\{(22-1)\ (n-1) \geq 15\}$

  $\{21\ (n-1) \geq 15\}$

  $21n-21 \geq 15$

  $21n \geq 15+21$

Diardy Shauman Rachmatan, 2019
UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK BIJI WIJEN HITAM (Sesamum indicum L.) HASIL FERMENTASI TERHADAP BAKTERI PATOGEN PENYEBAB PENYAKIT BAWAAN MAKANAN
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

21n $\geq$ 36

n $\geq$ 1,71 ~ 2

- Aplikasi sebagai *Food Sanitizer*

{(p-1) (n-1) $\geq$ 15}

{(20-1) (n-1) $\geq$ 15}

{19 (n-1) $\geq$ 1

19n $\geq$ 15+19

19n $\geq$ 34

n $\geq$ 1,79 ~ 2

Keterangan p = Jumlah perlakuan

n = Jumlah pengulangan

Parameter yang di amati dalam penelitian ini adalah pertumbuhan dan kematian bakteri patogen penyebab penyakit bawaan makanan dengan parameter zona hambat pada uji aktivitas antimikroba metode DDA, kekeruhan suspensi pada uji aktivitas metode dilusi cair (MIC), dan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada setiap konsentrasi pada aplikasi sebagai *food sanitizer*.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri patogen penyebab penyakit bawaan makanan. Sedangkan sampel penelitiannya adalah bakteri (*Salmonella* Typhimurium ATCC14028, *Kleibsiella pneumoniae* ATCC13773, *Escherichia coli* ATCC43895, *Enterobacter endrogenes* ATCC13048, *Proteus mirabilis* ATCC21100, *Staphylococcus aureus* ATCC29737, *Listeria monocytogenes* ATCC19112, dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027) yang sudah diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol biji wijen hitam (*Sesamum indicum* L.) hasil fermentasi.

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Sains Makanan, Fakulti Sains Makanan dan Teknologi, Universiti Putra Malaysia dan di Laboratorium Teknologi Pangan, Departemen Teknik Pangan, Fakultas

Teknik, Universitas Pasundan. Penelitian ini berlangsung dari Agustus 2018 hingga Desember 2018

3.5 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini seperti *beaker glass*, cawan Petri *disposable*, jarum ose, lemari pendingin, mikropipet, oven, parafilm, atau seperti yang tertera pada Lampiran 1. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan seperti aquades, daging paha ayam, biji wijen hitam, *antiseptic chlorhexidine*, DMSO 100%, etanol, inokulum bakteri patogen atau seperti yang tertera pada Lampiran 2.

3.6 Langkah Kerja

3.6.1 Tahap persiapan

3.6.1.1 Koleksi Sampel Biji Wijen Hitam (*Sesamuum indicum* L.)

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah biji wijen hitam (*Sesamuum indicum* L.) yang diperoleh dari Pasar Baru, Bandung, Jawa Barat, Indonesia yang telah disimpan di *Laboratory of Natural Products, Institute of Bioscience, Universiti Putra Malaysia.*

3.6.1.2 Fermentasi Biji Wijen Hitam (*Sesamuum indicum* L.)

Biji Wijen hitam yang diperoleh di *Press* menggunakan *Mechanical oil presser* untuk didapatkan ampasnya. Lalu di kukus selama 30 menit. Kemudian biji dikeringkan dan didinginkan dalam suhu ruangan selama beberapa jam. Lalu ditimbang hingga mencapai 100 g, kemudian dimasukkan ke dalam daun pisang dan dibungkus menggunakan plastik *wrap.* Setelah itu dimasukkan ke dalam sebuah wadah lalu disimpan pada suhu ruangan selama 7 hari. Setelah fermentasi selesai, sampel disimpan dan siap untuk di ekstraksi.

3.6.1.3 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian berlangsung terlebih dahulu dipersiapkan, diperiksa ketersediaan dan kelayakannya. Sebelum digunakan, alat-alat disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan dibungkus menggunakan plastik tahan panas pada suhu 121^0C, dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.6.1.4 Pembuatan media

Medium yang digunakan untuk *Disc Diffusion Assay* adalah MHA (*Mueller Hinton Agar*), untuk *MIC Assay* dan *MBC Assay* adalah MHA (*Mueller Hinton Agar*) dan MHB (*Meller Hinton Broth*), untuk aplikasi sebagai *food sanitizer* adalah EMB (*Eosin Methylen Blue*) agar untuk media *Escherichia coli*, *Coliform Agar* untuk media bakteri Coliform, XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*) agar untuk bakteri *Salmonella* atau *Kleibsiella*, dan PCA (*Plate Count Agar*) untuk *total plate count*.

3.6.2 Tahap Penelitian

3.6.2.1 Analisi Kadar Abu dan Air

- Kadar Abu

  Alu porselin diletakkan di dalam *oven* pada suhu 105°C selama 1 jam, lalu didinginkan dalam desikator. Lalu alu porselin ditimbang secara cepat dan akurat. Kemudian sampel biji yang sudah difermentasi ditimbang hingga sebanyak 3-5 gr. Setelah itu alu porselin berisi sampel dimasukkan ke dalam *muffle furnace* pada suhu 550°C selama 7-8 jam. Setelah itu alu porselin didinginkan beserta abu dalam desikator, lalu di timbang (AOAC,2005).

$$\sum \textbf{Kadar Abu} = \frac{(W_X + W_K) - (W_K)}{W_S} \times 100$$

Keterangan: W_x = Berat Abu

W_k = Berat alu porselin

W_s = Berat Sampel Biji Wijen Hitam

- Kadar Air

  Oven diatur pada suhu 105°C dan suhu dijaga agar tetap konstan. Setelah itu, alu porselin dibersihkan dan dikeringkan dalam oven minimal selama 30 menit. Setelah 30 menit, keluarkan alu porselin menggunakan penjepit lalu alu porselin didinginkan dalam desikator sampai mencapai suhu ruangan (sekitar 20 menit). Kemudian alu porselin ditimbang secara cepat dan akurat. Penimbangan setidaknya diulangi dua kali hingga diperoleh nilai yang konstan.

Lalu alu porselin di simpan kembali ke dalam desikator. Lalu 2-5 g sampel dimasukkan ke dalam alu porselin. Setelah itu alu porselin dan sampel dimasukkan ke dalam oven dan dibiarkan selama 7 jam. Lalu alu porselin yang tertutup dikeluarkan menggunakan penjepit dan segera diletakkan dalam desikator. Setelah dingin, alu porselin beserta sampel ditimbang. Penimbangan diulangi hingga berat yang diperoleh konstan (AOAC,2005).

$$\sum \textbf{Kadar Air} = \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \times 100$$

Keterangan: W_0 = Berat Sampel Sebelum Dikeringkan

W_t = Berat Sampel Sesudah Dikeringkan

3.6.2.2 Ekstraksi Biji Wijen Hitam

Ekstraksi dilakukan seperti yang dijelaskan dalam (Rukayadi dkk., 2008). Sampel yang sudah difermentasi, dikeringkan terlebih dahulu di dalam Oven selama 1-2 jam dalam suhu 50°C. Kemudian sampel di *blend* hingga halus. Setelah itu di timbang sebanyak 100gr, lalu ditambahkan etanol sebanyak 400 ml. Sampel di *shake* menggunakan *Shakerbath* pada suhu 40^{0}C dan kecepatan 80 rpm selama 24 jam. Lalu sampel di saring menggunakan Paper Whatman No. 1. Kemudian hasil penyaringan dipindahkan ke dalam *round bottom flask* steril yang sudah ditimbang. Lalu etanol dikeluarkan dengan cara menguapkannya menggunakan *Rotary Evaporator*. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam *Oven* selama 15-30 menit pada suhu 50^{0}C. Kemudian *round bottom flask* ditimbang kembali untuk menghitung ekstrak yang didapatkan dengan Rumus:

$$\sum \textbf{Konsentrasi Ekstrak} = \frac{(W_X + W_{RBF}) - (W_{RBF})}{W_S} \times 100$$

Keterangan: W_x = Berat Ekstrak

W_{RBF} = Berat *Round Bottom Flask*

W_s = Berat Sampel Biji Wijen Hitam

3.6.2.3 Persiapan Sampel Ekstrak

Konsentrasi ekstrak yang disiapkan adalah 10% dengan mencampur 1 g ekstrak biji wijen hitam hasil fermentasi dan 10 ml DMSO 100%

3.6.2.4 Kultur Murni

Kultur murni dilakukan seperti yang dijelaskan dalam (CLSI, 2017). Total strains yang digunakan 8 jenis bakteri yang diketahui sebagai bakteri patogen penyebab penyakit bawaan makanan, yaitu *Salmonella* Typhimurium ATCC14028, *Kleibsiella pneumoniae* ATCC13773, *Escherichia coli* ATCC43895, *Enterobacter endrogenes* ATCC13048, *Proteus mirabilis* ATCC21100, *Staphylococcus aureus* ATCC29737, *Listeria monocytogenes* ATCC19112, dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027. Semua bakteri ini di buat kultur murni dalam Medium MHA (*Mueller Hinton Agar*). Kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C.

3.6.2.5 Uji Antibakteri

3.6.2.5.1 *Disc Diffusion Assay* (DDA)

Uji DDA dilakukan seperti yang dijelaskan dalam (CLSI, 2012). Bakteri dengan jumlah sekitar 10^6 – 10^8 (Log_{10} CFU/ml) disebar dalam Mueller Hinton Agar (MHA) menggunakan *cotton buds* steril. Kemudian kertas cakram steril dengan diameter 6 mm diletakkan di atas permukaan kultur, dan 10 µL ekstrak biji wijen hitam di teteskan pada kertas cakram. CHX (Chlorohexidine) 0,1% digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif. Setelah itu, media diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Bukti zona bening menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri dan dan diameter diukur dalam satuan mm.

3.6.2.5.2 Inokulum Untuk MIC dan MBC

Cara pembuatan inokulum menginokulasi bakteri menggunakan *cotton buds* ke dalam 1 ml MHB (Mueller Hinton Broth), lalu di kocok menggunakan vortex (Inokulum pertama). Setelah itu, 10 µl dari inokulum pertama diambil dan dimasukkan ke dalam 10 ml MHB (Inokulum kedua). Untuk memastikan jumlah bakteri mecapai 10^6 - 10^8 (Log_{10} CFU/ml), 10 µl inoculum kedua diencerkan ke dalam 990 µl MHB (Pengenceran pertama = 10^{-}

^{2}). Lalu diambil 10µl dari pengenceran pertama ke dalam 990 µl MHB (Pengenceran kedua = 10^{-4}). Setelah itu, hasil pengenceran pertama dan pengenceran kedua, masing-masing disebar ke dalam MHA lalu diinkubasi selama 12-24 jam. Jika setelah ditumbuhkan koloni mencapai jumlah 10^6 - 10^8 (Log_{10} CFU/ml), maka inokulum layak digunakan untuk metode selanjutnya, yakni MIC dan MBC.

3.6.2.5.3 *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

MIC dan MBC dilakukan seperti yang dijelaskan dalam (CLSI, 2012). MIC dilakukan menggunakan metode mikrodilusi standar dua kali lipat dengan inokulum sekitar 10^6 – 10^8 CFU/ml. Terdapat 2 buah microtiter, 1 buah untuk perlakuan ekstrak, 1 buah untuk perlakuan CHX 0,1% (Kontrol positif). Untuk pembagian kolom, Kolom A (*Salmonella* Typhimurium ATCC14028), kolom B (*Kleibsiella pneumoniae* ATCC13773), kolom C (*Escherichia coli* ATCC43895), kolom D (*Enterobacter endrogenes* ATCC13048), kolom E (*Proteus mirabilis* ATCC21100), kolom F (*Staphylococcus aureus* ATCC29737), kolom G (*Listeria monocytogenes* ATCC19112), sedangkan kolom H (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027).

Ekstrak dengan konsentrasi 100 mg/ml (10%) dicampur dan diencerkan dua kali lipat pada masing-masing sumur yang mengandung inokulum. *Line* 12 dari sumur mikrotiter mengandung konsentrasi ekstrak tertinggi (50 mg/ml), sedangkan *line* 3 dari sumur mikrotiter mengandung konsentrasi ekstrak terendah (0,09 mg/ml). *Line* 1 berfungsi sebagai kontrol (Hanya MHB, tanpa inokulum, dan tanpa ekstrak), sedangkan *line 2* diisi dengan MHB + inokulum (tanpa ekstrak). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Untuk kontrol positif, sama seperti langkah kerja pada perlakuan ekstrak. Namun CHX yang digunakan 1 mg/ml (0,1%). Sehingga *line* 12 dari sumur mikrotiter mengandung konsentrasi ekstrak tertinggi (0,5 mg/ml), sedangkan *line 3* dari sumur microtiter mengandung konsentrasi ekstrak terendah (0,0009) mg/ml.

Nilai MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Rukayadi dkk, 2008), sedangkan

nilai MBC ditentukan dengan memasukkan 10 µl suspensi dari masing-masing sumur microtiter ke dalam medium MHA. Media kemudian di inkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam

3.6.2.5.4 Aplikasi Sebagai *Food Sanitizer* Pada Daging Paha Ayam Mentah

Aplikasi dilakukan seperti yang dijelaskan dalam (Yusoff dkk., 2010). Sampel daging paha ayam mentah diberi perlakuan air keran, *distilled water*, dan ekstrak biji wijen hitam (*Sesamum indicum* L.) hasil fermentasi dengan konsentrasi 0,05%, 0,5%, atau 5% (Mikrodilusi 10x lipat).

Daging paha ayam mentah di rendam dalam botol kaca secara terpisah pada interval waktu yang berbeda (0 jam dan 1 jam) dan pada suhu yang berbeda (suhu 4ºC dan suhu 25ºC/suhu ruangan) untuk menentukan viabilitas pertumbuhan mikroflora. Untuk pertumbuhan bakteri, 1 ml dari masing-masing perlakuan diencerkan dengan PBS 1% menjadi pengenceran 10^{-2} dan 10^{-4}. Kemudian 10 µl dari masing-masing seri pengenceran disebar pada berbagai jenis medium yakni XLD agar, PCA, Coliform agar, dan EMB agar, kemudian di inkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam. Jumlah koloni dihitung dalam Log_{10} CFU/ml.

3.6.3 Analisis Data

3.6.3.1 Uji Statistik

Analisis data hasil eksperimen menggunakan uji One Way Anova dan Uji Tukey menggunakan aplikasi Minitab 18