

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh objek yang menjadi sasaran riset. Populasi pertama yang digunakan pada riset ini adalah cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang masih hidup dan segar yang diperoleh dari CV Kasper Rejosari Group yang beralamatkan Perumahan Kasongan Permai, Jl. Rembulan No. A6, Kasongan, Bantul, Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian adalah cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dewasa, umur $\pm$ 3 bulan, ditandai dengan adanya klitellium yang menebal lebih terang dari warna tubuh. Klitellium terletak diantara bagian anterior dan posterior.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel Utama

Variabel utama, pertama serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang diekstraksi dengan pelarut asam asetat 20%; 40%; dan 80% terhadap bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063.

Variabel utama, kedua aktivitas antibakteri ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Klebsiella pneumoniae*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang teridentifikasi tersebut dapat diklasifikasikan pada berbagai macam variabel yaitu variabel

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sering berubah dan tujuannya adalah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan variasi konsentrasi pelarut 20%; 40% dan 80%.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung merupakan titik pusat permasalahan yang menjadi pilihan pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri terhadap diameter zona hambat *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali merupakan

variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditentukan kelayakannya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat direplikasi oleh peneliti lain. Variabel terkendali dalam penelitian ini ialah media pertumbuhan, suhu dan waktu inkubasi.

C. Definisi Operasional Penelitian

Pertama, *Lumbricus rubellus* adalah cacing tanah yang masih hidup dan segar diperoleh dari CV Kasper Rejosari Group dengan alamat Perumahan Kasongan Permai, Jl. Rembulan No. A6, Kasongan, Bantul, Yogyakarta.

Kedua, Serbuk *Lumbricus rubellus* adalah serbuk dari cacing tanah yang sebelumnya sudah dicuci, ditiriskan kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan sinar matahari serta dilakukan penggerusan hingga menjadi serbuk.

Ketiga, ekstrak *Lumbricus rubellus* adalah ekstrak yang didapat dari hasil ekstraksi menggunakan metode maserasi serbuk *Lumbricus rubellus* dengan pelarut asam asetat 20%; 40% dan 80% kemudian, dipekatkan dengan tujuan untuk mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, asam asetat glasial adalah pelarut asam asetat 100% *anhydrous for analysis* yang dibuat di Jerman, yang diencerkan menjadi 20%; 40% dan 80% untuk digunakan sebagai pelarut ekstraksi cacing tanah.

Kelima, *Bacillus Cereus* ATCC 10876 adalah bakteri uji Gram positif yang diperoleh dari Laboratorium Uji Mikrobiologi, Jakarta Pusat, Indonesia.

Keenam, *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri uji Gram negatif yang diperoleh dari Laboratorium Uji Mikrobiologi, Jakarta Pusat, Indonesia.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri adalah pengujian antibakteri ekstrak *Lumbricus rubellus* yang dilakukan dengan menggunakan metode difusi. Uji difusi digunakan untuk menentukan sensitivitas mikroba uji terhadap *Lumbricus rubellus*. Metode ini dilakukan dengan menggunakan kertas cakram. Media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri dimasukkan kertas cakram dan diisi dengan senyawa uji. Teknik cakram digunakan dalam uji difusi dengan menggunakan konsentrasi ekstrak 50% agar dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Aktivitas antimikroba diukur dengan memeriksa diameter zona hambat pada media uji.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan ialah sarung tangan, timbangan analitik, blender, plakon, *stirrer*, gelas ukur, *beaker glass*, *autoclave*, oven, kapas, kertas saring, nampan, ember, lampu bunsen, ose, pipet ukur, mikropipet, tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung, botol timbang, cawan petri, corong buchner, spidol, korek api, kertas label, vial, incubator, inkas, eksikator, sterling-bidwell, labu, lemari asam, *waterbath*, objek glass, mikroskop, objek glass, kertas cakram, cawan petri, kapas lidi steril, jangka sorong.

2. Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan ialah *Lumbricus rubellus*, asam asetat, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063, aquadest steril, NaCl 0,9 %, alkohol 96%, kloramfenikol, toluen, FeCl_3 , H_2SO_4 , Na_2SO_4 , Cu_2SO_4 , HCL 2N, HNO_3 , H_2O_2 3%, DMSO 4%, pereaksi millon, pereaksi mayer, reagen dragendorff, reagen wagner, NaOH pekat, NaOH 10%, spiritus, media BCA, media MCA, media MHA, media NA miring, media KIA, media SIM, media LIA, media sitrat, plasma darah kelinci, media BHI, pewarna kristal violet, pewarna safranin, pewarna Gram B, pewarna Gram C, pewarna malachite green, standar mc farland 0,5 CFU/ml sebagai pembanding.

E. Jalannya Penelitian

Secara garis besar, dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak *Lumbricus rubellus* terhadap bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063.

1. Pengambilan Sampel

Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang diperoleh dari CV Kasper Rejosari Group yang beralamatkan Perumahan Kasongan Permai, Jl. Rembulan No. A6, Kasongan, Bantul, Yogyakarta, pada bulan Januari tahun 2023.

2. Determinasi

Determinasi *Lumbricus rubellus* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3. Pembuatan Serbuk Bahan Uji

Bahan uji yang sudah diperoleh dari CV Kasper Rejosari Group (Perumahan Kasongan Permai, Jl. Rembulan No. A6, Kasongan,

Bantul, Yogyakarta) berupa *Lumbricus rubellus* yang masih hidup dan segar. Cacing 16 kg dibersihkan dari kotoran, dicuci dengan air bersih dan tiriskan. Selanjutnya, cacing tanah tersebut dikeringkan menggunakan sinar matahari. Cacing tanah yang telah dikeringkan, dihancurkan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.

4. Penetapan Susut Pengerinan Serbuk *Lumbricus rubellus*

Botol timbang disiapkan, dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit, lalu ditimbang. Hal tersebut dilakukan hingga memperoleh bobot botol timbang yang konstan atau perbedaan hasil antara 2 penimbangan tidak melebihi 0,005 g. Bahan uji ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam botol timbang. Bahan uji kemudian dikeringkan pada suhu 105°C hingga 5 jam lalu ditimbang kembali. Proses pengeringan dilanjutkan dan timbang kembali selama 1 jam hingga perbedaan antara penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000) didalam (Indrasuari *et al.*, 2014). Susut pengeringan dapat dihitung dengan persamaan dibawah ini.

$$\text{Susut Pengerinan (100\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan ; a = berat awal simplisia (g)

B = berat akhir simplisia (g)

5. Penetapan kadar air Serbuk *Lumbricus rubellus*

Penetapan kadar air serbuk dilakukan dengan menggunakan metode *Sterling-Bidwell*. Disiapkan alat destilasi *Sterling-Bidwell* dan toluen jenuh air. Sebanyak 15 g serbuk ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu kering. $\pm$ 100 mL toluen jenuh air dimasukkan ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kemenkes 2011) didalam (Febriyanti 2018).

6. Pembuatan Ekstrak *Lumbricus rubellus*

Serbuk *Lumbricus rubellus* diekstraksi dengan metode maserasi, yakni 500 Gram serbuk *Lumbricus rubellus* direndam dalam 500 mL pelarut asam asetat 20%, berikutnya dilakukan pengadukan menggunakan stirrer selama 3 jam. Diamkan selama 24 jam, Sampel kemudian disaring dengan memakai corong buchner untuk memisahkan filtrat dengan ampas. Setelah itu ampas diremaserasi dalam 250 mL asam asetat 20% selama 24 jam. Filtrat yang didapat, ditaruh dilemari asam untuk diuapkan, tujuan penguapan di lemari asam untuk menyingkirkan asam asetat serta dilanjutkan dengan penguapan di atas

waterbath yang suhunya dijaga sekitar 35°C untuk memperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara ekstrak yang diperoleh dengan bobot serbuk simplisia yang ditimbang (Ilahi, 2018). Dilakukan cara yang sama untuk pembuatan ekstrak cacing tanah dengan pelarut asam asetat 40% dan 80%. Ekstrak yang telah dimaserasi dengan pelarut asam asetat 20%; 40% dan 80% diberikan label pada setiap ekstrak. Label ekstrak A adalah ekstrak yang dimaserasi dengan pelarut asam asetat 80%, label ekstrak B adalah ekstrak yang dimaserasi dengan pelarut asam asetat 40% dan label ekstrak C adalah ekstrak yang dimaserasi dengan pelarut asam asetat 20%. Skema kerja pembuatan ekstrak *Lumbricus rubellus* dapat dilihat pada gambar 6.

7. Penetapan Kadar Air Ekstrak *Lumbricus rubellus*

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan metode gravimetri. Tujuannya adalah untuk mengetahui kadar air pada simplisia, terkait dengan kemurnian dan kontaminasi yang dapat terjadi. Uji kadar air ekstrak dilakukan dengan Sampel berupa ekstrak A; ekstrak B dan ekstrak C *Lumbricus rubellus* ditimbang lebih kurang 10 g, dimasukkan ke dalam wadah yang ditara. Keringkan selama 5 jam pada suhu 105°C dan timbang. Lakukan pengeringan dan timbang selang waktu 1 jam sampai ada perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% agar mencapai keseimbangan gravimetri tetap (Kemenkes RI, 2017).

8. Uji Bebas Asam Asetat

Uji bebas asam asetat dilakukan untuk pengujian terhadap ekstrak *Lumbricus rubellus*. Tujuan dilakukan uji bebas asam asetat adalah untuk mengetahui ekstrak telah bebas dari pelarut asam asetat yang digunakan untuk maserasi ekstrak *Lumbricus rubellus*. Uji bebas asam asetat dilakukan dengan penambahan FeCl_3 dan H_2SO_4 . Uji positif adanya CH_3COOH dengan menggunakan FeCl_3 ditandai terbentuknya warna merah tua dan setelah dididihkan akan timbul endapan dan warna merah kecoklatan. Jika ditambahkan H_2SO_4 , uji positif adanya CH_3COOH ditandai dengan terbentuknya bau asam asetat yang khas setelah dilakukan pemanasan. Uji bebas asam asetat dilakukan terhadap ekstrak A; ekstrak B dan ekstrak C.

9. Identifikasi Kandungan Senyawa Alkaloid

Tujuan identifikasi kandungan senyawa alkaloid adalah untuk menguji kebenaran kandungan senyawa alkaloid yang ada pada serbuk

dan ekstrak A; ekstrak B dan ekstrak C *Lumbricus rubellus*. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan uji Mayer, Dragendorff dan Wagner.

Penyiapan sampel serbuk dan ekstrak *Lumbricus rubellus* dilakukan dengan menimbang sebanyak 10 mg, tambahkan 1 mL HCL 2N dan 9 ml aquades. Panaskan diatas penangas air selama 2 menit. Dinginkan pada suhu ruangan lalu disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk percobaan uji Mayer, Dragendorff dan Wagner.

Uji Mayer dilakukan dengan menambahkan 3 tetes filtrat, tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer. Hasil positif jika terbentuk endapan berwarna putih kekuningan.

Uji Dragendorff dilakukan dengan menambahkan 3 tetes filtrat, ditambahkan dengan reagen Dragendorf hasil positif ditandai dengan endapan berwarna merah sampai dengan warna jingga (Almasyah *et al.*, 2014).

Uji Wagner dilakukan dengan cara menambahkan 3 tetes filtrat ditambahkan dengan reagen Wagner dan hasil positif ditandai dengan endapan kecoklatan (Tri utami, 2014) dalam (Illing *et al.*, 2017).

10. Identifikasi Kandungan Senyawa Protein

Tujuan identifikasi kandungan senyawa protein adalah untuk menguji kebenaran kandungan senyawa protein yang ada pada serbuk dan ekstrak A; ekstrak B dan ekstrak C *Lumbricus rubellus*. Identifikasi senyawa protein yang terkandung dalam *Lumbricus rubellus* dilakukan dengan menggunakan metode uji kualitatif. Uji kualitatif protein yang dilakukan adalah uji Biuret, Xantoprotein dan Millon. Identifikasi kandungan senyawa protein dilakukan di laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia.

Penyiapan sampel serbuk dan ekstrak dilakukan dengan menimbang sebanyak 10 mg *Lumbricus rubellus* ditambahkan 40 ml aquades, dipanaskan hingga mendidih lalu disaring. Filtrat yang diperoleh sebagai larutan sampel.

Uji Biuret dilakukan dengan memasukkan sampel ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL. Ditambahkan 1 mL NaOH 10% dan CuSO₄ 0,1 % sebanyak 1 tetes diaduk hingga homogen. Reaksi positif terbentuk warna kemerahan atau ungu.

Uji Xantoprotein dilakukan dengan cara memasukkan 1-2 mL sampel kedalam tabung reaksi. Masukkan 1 ml HNO₃ pekat dan amati

adanya endapan putih yang terbentuk, kemudian panaskan selama 1 menit. Dinginkan di air keran, setelah dingin tambahkan NaOH pekat hingga suasana basa. Perubahan akan terjadi dengan terbentuknya gumpalan atau cincin warna kuning.

Uji Millon dilakukan dengan cara memasukkan sampel uji sebanyak 3 ml dan masukkan 10 tetes pereaksi Millon. Panaskan hingga mendidih serta amati perubahan warna yang terbentuk. Reaksi positif terbentuk warna merah jika dipanaskan.

11. Peremajaan Bakteri

Bakteri uji yang digunakan adalah *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063. *Bacillus cereus* ATCC 10876 diremajakan dengan membiakkan isolat bakteri pada media NA. Bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 diambil menggunakan jarum ose steril kemudian isolat digoreskan pada media miring NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Wijayati *et al.*, 2014). Bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 diremajakan di dalam agar miring NA yang biakan murni diinokulasikan 1 ose menggunakan teknik goresan seperti zig-zag pada permukaan medium dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Nikmah *et al.*, 2022).

12. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dengan cara penggoresan. Identifikasi bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 menggunakan media BCA (*Bacillus cereus agar*) dengan mengambil 1 jarum ose steril biakan murni *Bacillus cereus* ATCC 10876 diinokulasikan ke cawan petri yang berisi media BCA dengan teknik goresan. *Bacillus cereus* ATCC 10876 diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif apabila terdapat pertumbuhan koloni dengan ciri-ciri koloni berwarna biru dan dikelilingi daerah keruh (soemarno, 2000) didalam (Azizah dan Octavia, 2022). Identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 menggunakan media *Macconkey Agar* (MCA) dengan mengambil 1 jarum ose biakan murni *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 diinokulasikan ke cawan petri dengan teknik goresan. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Makalew *et al.*, 2016). Bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 selanjutnya diidentifikasi dengan cara pewarnaan Gram, spora, kapsul, dan identifikasi secara biokimia menggunakan media KIA, SIM, LIA, Sitrat, uji katalase, dan uji

motilitas.

13. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dilakukan dengan cara mengambil 1 ose *Bacillus cereus* ATCC 10876 yang disuburkan dalam tabung reaksi steril yang berisi BHI 10 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dari media BHI yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Sulistiani *et al.*, 2020). Pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dilakukan dengan cara mengambil 1 jarum ose *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dari media MCA yang telah diinkubasi selama 24 jam, dimasukkan kedalam tabung berisi BHI. Suspensi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 yang digunakan adalah bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/mL. Suspensi bakteri disetarakan kekeruhannya menggunakan larutan standar McFarland 0,5 (Wulandari dan Asih, 2019).

14. Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Identifikasi *Bacillus cereus* ATCC 10876 dengan pewarnaan Gram dilakukan dengan mengambil 1 jarum ose bakteri dan 1 jarum ose aquades ditaruh diatas kaca objek, diratakan, kemudian preparat yang telah jadi dilakukan fiksasi diatas api bunsen. Sampel bakteri diwarnai dengan Gram A (*Kristal violet*), Gram B (*lugol iodine*), Gram C (*alkohol*), dan Gram D (*safranin*). Setiap tahapan pewarnaan diinkubasi selama 1 menit dengan suhu ruang lalu dicuci dengan aquades. Preparat pewarnaan Gram diamati dibawah mikroskop pada perbesaran lensa objektif 100x dan lensa okuler 10x (Marler *et al.*, 2017). Identifikasi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dilakukan dengan mengambil kaca objek untuk membuat preparat apusan lalu difiksasi. Preparat apusan diwarnai dengan Gram A (*kristal violet*), Gram B (*mordant*), Gram C (*pelarut*), dan Gram D (*safranin*), preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran lensa 100x (Wulandari dan Asih, 2019).

15. Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Spora

Bakteri yang diidentifikasi dengan pewarnaan endospora adalah *Bacillus cereus* ATCC 10876 tujuan dari pewarnaan spora adalah untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu menghasilkan spora. Spora adalah bentuk dari bakteri untuk mempertahankan diri dari kondisi yang kurang mendukung untuk kehidupan dari bakteri tersebut. Spora akan lebih tahan dalam kondisi yang ekstrim misalnya dalam kondisi

kering, panas dan adanya senyawa kimia yang bersifat racun terhadap bakteri tersebut. Cat yang digunakan untuk mewarnai spora adalah malachite green. Spora yang berhasil diwarnai akan mengikat kuat cat warna tersebut sehingga ketika ditutup kembali dengan cat warna lain (Safranin) spora akan tetap mempertahankan warna awalnya. Hasil pewarnaan spora menunjukkan spora akan berwarna hijau sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah (Wulandari dan Purwaningsih 2020).

Metode identifikasi bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dilakukan dengan mengambil 1 jarum ose biakan bakteri murni dan 1 jarum ose aquades letakan pada kaca objek, diratakan dan lakukan fiksasi. Preparat lalu dibungkus menggunakan kertas saring dan ditetesi dengan cat *malachite green*, kertas saring dilepas dan bilas menggunakan air mengalir. Preparat dikeringkan di atas api lalu ditetesi cat safranin. Hasil pewarnaan dilihat menggunakan mikroskop perbesaran lensa objektif 100x dan okuler 10x (Oktari *et al.*, 2017).

16. Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Kapsul

Bakteri yang diidentifikasi dengan pewarnaan kapsul adalah *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063. Pewarnaan kapsul menggunakan Teknik *Burrry Gins* yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya kapsul pada bakteri. Kapsul bakteri mudah ditembus zat warna namun sukar dalam mengikat zat warna. Metode identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dilakukan dengan cara mengambil 2 objek glass, teteskan dengan 1 tetes nigrosin lalu campurkan dengan 1 tetes biakan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063. Apusan dibuat menggunakan objek gelas lainnya dan biarkan kering. Preparat apusan ditetesi dengan pewarna kristal violet lalu diamkan hingga 2 menit, cat yang berlebih pada preparat apusan dicuci menggunakan air mengalir. Preparat lalu diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 100x (Wulandari dan Asih, 2019).

17. Identifikasi dengan uji biokimia

Identifikasi uji biokimia terhadap bakteri uji *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dilakukan dengan menanam isolat bakteri tersebut pada media KIA, LIA, SIM, Sitrat, uji katalase dan uji koagulase. Untuk identifikasi bakteri uji *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dilakukan penanaman bakteri uji pada media KIA, LIA, SIM, dan Sitrat. Identifikasi *Bacillus cereus* ATCC 10876 dilakukan dengan menanam bakteri pada media uji

katalase dan uji koagulase pada bakteri uji.

Identifikasi pada media KIA bakteri diinokulasikan dengan metode tusuk dan gores dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tujuan diinokulasikan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 terhadap media KIA adalah untuk mengetahui fermentasi karbohidrat dan pembentukan sulfida.

Identifikasi pada media SIM bakteri diinokulasikan dengan cara tusukan lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Media Sulfide Indole Motility digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dalam membentuk cincin indol, kemampuan motilitas bakteri dan pembentukan sulfida oleh bakteri tersebut.

Identifikasi pada media LIA bakteri diinokulasikan dengan cara tusuk dan gores lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tujuan inokulasi pada media LIA untuk mengenal kemampuan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dalam deaminasi lisin.

Identifikasi pada media *citrate* bakteri diinokulasikan dengan metode gores lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tujuan diinokulasikan pada media *citrate* untuk mengetahui sumber karbon dari bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 (Wulandari dan Asih, 2019).

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 menghasilkan enzim katalase. Identifikasi dengan uji katalase dilakukan dengan mengambil 1-2 *needle* biakan bakteri, diletakan pada kaca objek lalu ditetesi dengan 1-2 tetes H₂O₂ 3%.

Uji koagulase dilakukan untuk mengetahui enzim koagulase yang terikat ke dinding sel bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876. Identifikasi dengan uji koagulase dilakukan dengan mengambil *needle* 1-2 biakan bakteri diinokulasikan, diletakan dalam 5 mL plasma darah kelinci dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Bimantara *et al.*, 2022).

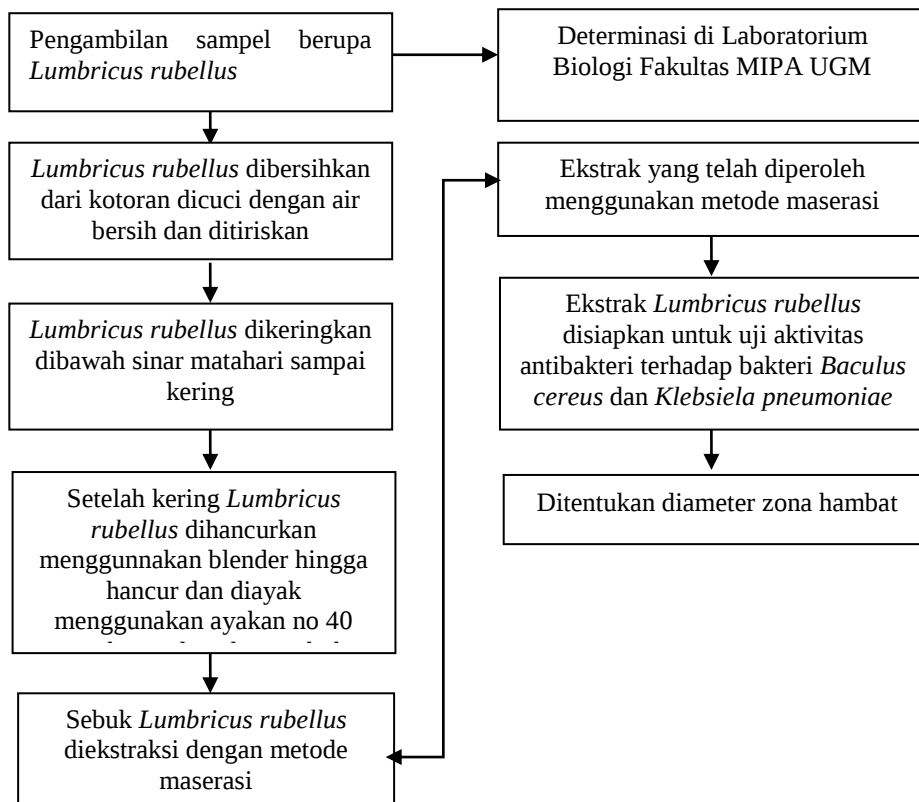
18. Uji Aktivitas Antibakteri Secara Difusi

Uji aktivitas antibakteri penelitian ini menggunakan metode difusi. Tujuan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi adalah untuk menentukan ekstrak dengan pelarut asam asetat 20%; 40% dan 80% dalam menghambat *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 serta untuk mengetahui setiap

ekstrak yang mempunyai aktivitas antibakteri yang baik antara *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063.

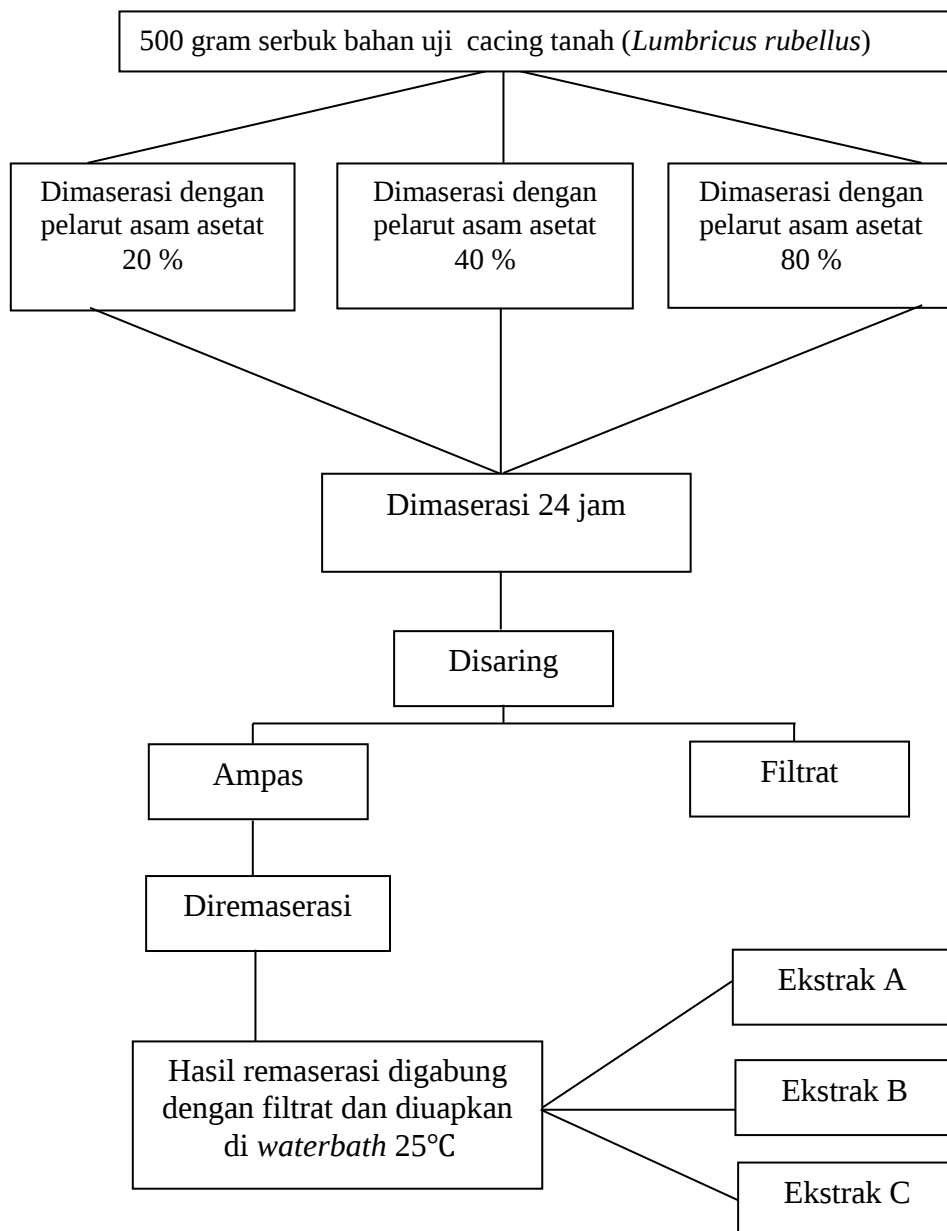
Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara difusi dengan menyiapkan ekstrak A; ekstrak B dan ekstrak C. Ekstrak A; ekstrak B dan ekstrak C dilarutkan menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) 4% dengan konsentrasi setiap ekstrak adalah 50%. Siapkan 3 cawan Petri steril berisi 50 mL media *Muller Hinton Agar* (MHA). Gunakan kapas lidi steril untuk menginokulasi bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063, diamkan selama 10 sampai 15 menit agar bakteri berdifusi ke dalam media. Selanjutnya adalah membuat 5 bagian pada cawan petri yang kertas cakram telah terdapat sampel ekstrak A; ekstrak B; ekstrak C; kontrol positif (Kloramfenikol 30µg) dan kontrol negatif (DMSO 4%) dengan lama kertas cakram direndam pada tiap-tiap sampel adalah 5 menit.

Bagian A diisi menggunakan kertas cakram ekstrak A *Lumbricus rubellus*. Bagian B diisi kertas cakram ekstrak B *Lumbricus rubellus*. Bagian C diisi kertas cakram ekstrak C *Lumbricus rubellus*. Bagian D diisi kertas cakram kloramfenikol 30 µg dan bagian E diisi dengan DMSO 4%. Cawan kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat diukur dalam milimeter (mm) dengan menggunakan jangka sorong untuk mengamati diameter daerah transparan di sekitar cakram. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

19. Skema jalannya penelitian *Lumbricus rubellus*.

Gambar 5. Skema kerja pembuatan ekstrak *Lumbricus rubellus* dan proses uji aktivitas antibakteri ekstrak *Lumbricus rubellus*

20. Skema pembuatan ekstrak *Lumbricus rubellus*.

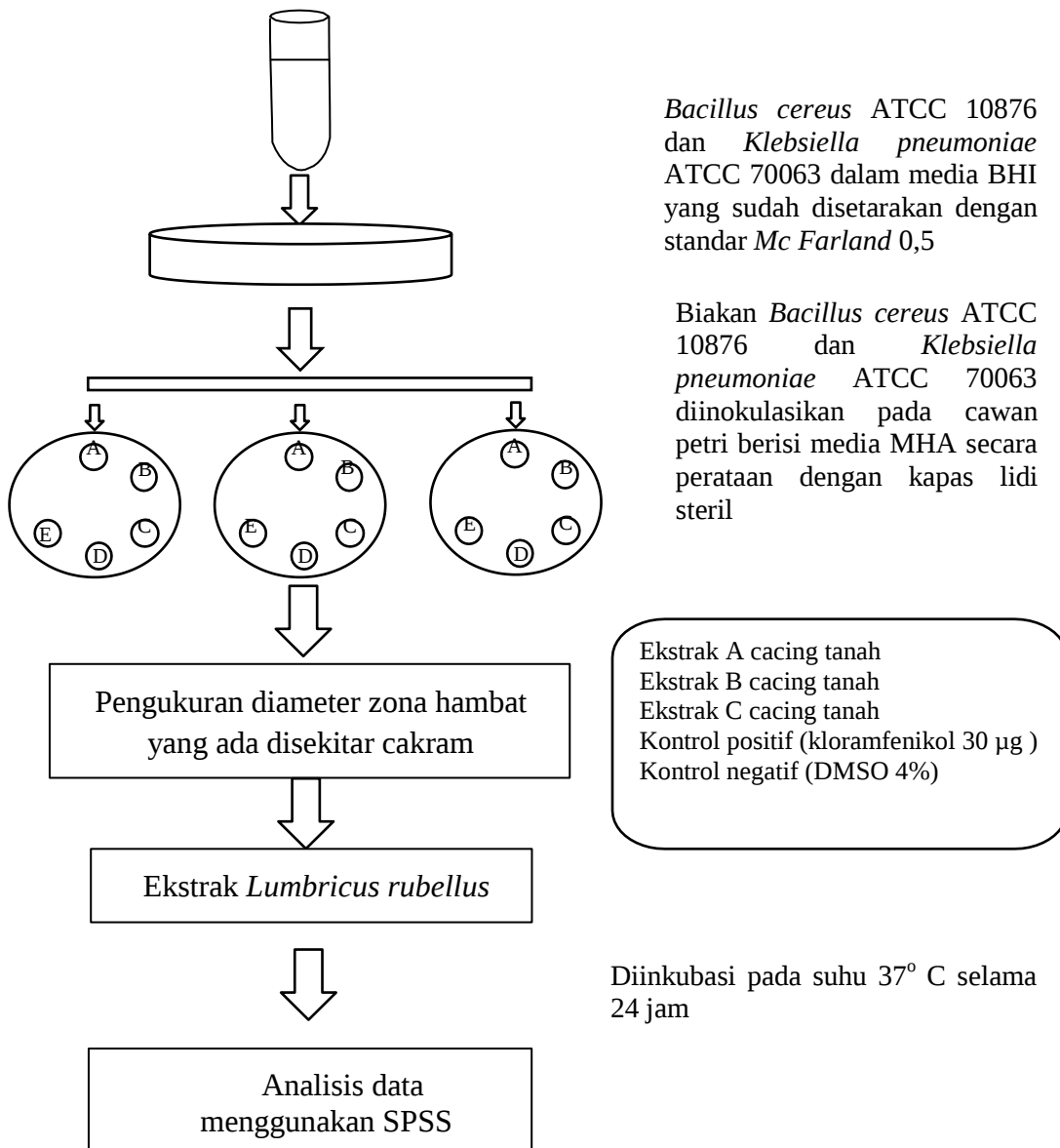


Gambar 6. Skema Pembuatan Ekstrak *Lumbricus rubellus* dengan pelarut asam asetat.

Keterangan :

- Ekstrak A : Ekstrak dimaserasi dengan pelarut asam asetat 80%
- Ekstrak B : Ekstrak dimaserasi dengan pelarut asam asetat 40%
- Ekstrak C : Ekstrak dimaserasi dengan pelarut asam asetat 20%

21. Skema uji aktivitas antibakteri metode difusi.



Keterangan

- Ekstrak A : Ekstrak yang dimaserasi dengan pelarut asam asetat 80%
 Ekstrak B : Ekstrak yang dimaserasi dengan pelarut asam asetat 40%
 Ekstrak C : Ekstrak yang dimaserasi dengan pelarut asam asetat 20%

Gambar 7. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak *Lumbricus rubellus* dengan pelarut asam asetat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Bacillus cereus*.

F. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan melihat diameter zona hambat ekstrak cacing tanah dengan pelarut asam asetat terhadap *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dengan konsentrasi sediaan uji ekstrak 50% dan dibandingkan dengan kontrol positif. Untuk menentukan ekstrak mana yang lebih efektif dalam menghambat bakteri *Bacillus cereus* ATCC 10876 dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 dan bakteri mana yang efektif dihambat menggunakan ekstrak cacing tanah dianalisis data dengan menggunakan spss dengan metode analisis *oneway* anova dan *T test*.