

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai September 2016. Tempat penelitian di Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto.

3.2 Alat yang digunakan dalam penelitian

3.2.1 Alat pengumpulan dan pembuatan simplisia daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa*

Alat yang digunakan yaitu timbangan, loyang, plastik, baki, saringan, gunting, oven, blender, dan baki.

3.2.2 Alat pembuatan ekstrak tumbuhan mangrove *R. stylosa*

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak tumbuhan mangrove *R. stylosa* yaitu rotary evaporator, gelas ukur 100 ml, botol, toples, kertas saring, saringan kecil, *wrapping*, water bath, pengaduk, cawan porselin, dan timbangan analitik.

3.2.3 Alat uji antibakteri

Alat-alat untuk uji bakteri antara lain cawan Petri besar, Erlenmeyer, Beaker glass, gelas ukur 10 ml, pinset, tabung konikal, pipet tetes, aluminium foil, *wrapping*, rak tabung reaksi, label, spatula, timbangan analitik, lampu Bunsen, kertas Watsman steril, inkubator, autoklaf, vortex, laminar air flow (LAF), jangka sorong, pinset, kapas, hot plate, pipet ukur, dan filter pump.

3.2.4 Alat uji fitokimia ekstrak daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa* menggunakan uji warna pada plat KLT

Timbangan analitik, gelas ukur 10 ml dan 5 ml, plat KLT, pipet tetes, lampu UV, cawan porselein, penyemprot pereaksi, silica gel, botol kecil, pengaduk, bejana KLT, hot plate, botol kultur, dan pisau.

3.3 Bahan yang digunakan dalam penelitian

3.3.1 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* dengan strain GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04 yang digunakan berasal dari kultur murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Keguruan dan Ilmu pendidikan Universitas Muhammadiyah Purwokerto.

3.3.2 Daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa*

Daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa* yang digunakan diperoleh dari Desa Karang Talun, Cilacap, Jawa tengah.

3.3.3 Media yang digunakan

Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *A. hydrophila* adalah *Glutamat Starch Phenile* (GSP), *Tryptic Soy Agar* (TSA), dan *Tryptic Soy Broth* (TSB).

3.3.4 Bahan untuk uji fitokimia ekstrak daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa* menggunakan uji warna pada plat KLT

Bahan-bahan yang digunakan uji fitokimia ekstrak *R. stylosa* adalah kloroform, metanol, n-heksan, pereaksi sitroborat, pereaksi Dragendrof, pereaksi FeCl, dan pereaksi anisaldehyd asam sulfat.

3.3.5 Pelarut yang digunakan dalam pembuatan ekstrak dan pembuatan konsentrasi ekstrak tumbuhan mangrove *R. Stylosa*

Pelarut-pelarut yang digunakan dalam pembuatan ekstrak *R. stylosa* adalah pelarut polar metanol, pelarut non polar n-heksan, pelarut DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) 10%, dan akuades.

3.4 Rancangan penelitian

Metode yang akan digunakan dalam penelitian adalah metode eksperimen, sedangkan rancangan yang akan digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 faktor berupa : A. organ dari tumbuhan mangrove *R. stylosa* yaitu batang dan daun, B. konsentrasi yang digunakan 0%, 10%, 20%, dan 30%, dan C. strain bakteri *A. hydrophila* yaitu GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04, dengan 48 kali perlakuan dengan 3 kali ulangan.

3.5 Cara kerja

3.5.1 Pengumpulan dan pembuatan simplisia daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa*

Daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa* terlebih dahulu dikumpulkan dari hutan bakau, kemudian dicuci sampai bersih. Daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa* dipotong-potong menjadi beberapa bagian dengan ukuran masing-masing 4 cm. Secara terpisah potongan dari daun dan batang dikeringkan menggunakan oven 60⁰C, selanjutnya diblender sampai menjadi serbuk halus. Simplisia daun dan batang mangrove *R. stylosa* tersebut siap untuk digunakan untuk uji selanjutnya.

3.5.2 Pembuatan ekstrak daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa*

Pembuatan ekstrak daun dan batang tumbuhan mangrove dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 100 g simplisia daun dan batang *R. stylosa* masing-masing direndam dengan 500 ml n-heksan (non polar) selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Ekstrak n-heksan yang diperoleh dipisahkan ampasnya. Ekstrak yang diperoleh lalu diuapkan n-heksenanya dengan vacum evaporator sehingga menjadi ekstrak kental yang kemudian akan digunakan untuk uji antibakteri, sedangkan ampasnya dikeringkan dan direndam dengan 500 ml metanol (polar) selama 2 x 24 jam. Ekstrak metanol yang diperoleh dipisahkan dari dan ampasnya. Ekstrak metanol kemudian diuapkan metanolnya dengan vacum evaporator sehingga menjadi ekstrak kental yang akan digunakan untuk uji antibakteri, sedangkan untuk ampasnya tidak digunakan lagi.

3.5.3 Uji fitokimia menggunakan uji warna pada plat KLT terhadap ekstrak tumbuhan mangrove *R. stylosa*

Menimbang ekstrak 0,1 g, kemudian dilarutkan dengan pelarut metanol 5 ml. Membuat fase gerak dengan dengan mencampurkan larutan kloroform 9 ml dan metanol 1 ml (9:1) selama 15 menit. Totolkan ekstrak pada plat KLT, sebelumnya plat KLT dipotong dengan ukuran 1x5 cm (atas 0,5 cm dan bawah 1 cm), selanjutnya plat KLT yang sudah ditotolkan ekstrak masukkan ke dalam botol yang berisi larutan kloroform 9 ml dan metanol 1 ml sampai meresap ke atas, plat KLT diambil dan dikeringkan

menggunakan hot plate, kemudian dilihat di UV_{366 nm}, kemudian disemprotkan dengan pereaksi sesuai uji senyawa yang akan diuji.

a. Uji Flavonoid

Sampel uji ditotolkan pada plat KLT dengan eluen terbaik yaitu pelarut kloroform 9 ml dan metanol 1 ml yang digunakan sebagai fase gerak. Bercak yang telah terelusi kemudian dideteksi dengan pereaksi sitroborat. Adanya flavonoid ditandai dengan bercak yang terlihat berwarna kuning atau ungu.

b. Uji Alkaloid

Sampel uji ditotolkan pada plat KLT dengan eluen terbaik yaitu pelarut kloroform 9 ml dan metanol 1 ml yang digunakan sebagai fase gerak. Bercak yang telah terelusi dideteksi penyemprotan pereaksi Dragendorff. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya bercak berwarna kuning jingga.

c. Uji Terpenoid

Sampel uji ditotolkan pada plat KLT dengan eluen terbaik yaitu pelarut kloroform 9 ml dan metanol 1 ml yang digunakan sebagai fase gerak. Bercak yang terelusi dideteksi penyemprotan pereaksi anisaldehyd asam sulfat. Adanya terpenoid ditunjukkan oleh terbentuknya bercak berwarna coklat.

d. Uji Tanin

Sampel uji ditotolkan pada plat KLT dengan eluen terbaik yaitu pelarut kloroform 9 ml dan metanol 1 ml yang digunakan sebagai fase gerak.

Bercak yang terelusi dideteksi penyemprotan pereaksi FeCl. Adanya terpenoid ditunjukkan oleh terbentuknya bercak berwarna coklat orange.

3.5.4 Sterilisasi peralatan dan medium tumbuh

Sterilisasi peralatan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C dan tekanan 15 psi selama 15-20 menit. Autoklaf kemudian dimatikan dan dibiarkan tekanannya turun sampai menunjukkan ke angka nol sebelum alat dan media yang telah steril dikeluarkan.

3.5.5 Pembuatan media tumbuh bakteri *A. hydrophila*

3.5.5.1 Pembuatan medium *Glutamat Starch Phenile (GSP)*

Mencampurkan 4,5 g bubuk GSP dengan 100 ml akuades. Campuran tersebut dipanaskan sambil terus diaduk hingga benar-benar larut. Media GSP tersebut dituang dalam tabung reaksi dengan volume masing-masing sebanyak 12 ml. Medium tersebut dibuat sebagai medium selektif bagi bakteri *A. hydrophila*. Setiap tabung selanjutnya ditutup menggunakan alumunium foil dan dililit dengan *wrapping*. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 psi (1,02 atm) selama 15-20 menit.

3.5.5.2 Pembuatan medium *Tryptic Soy Broth (TSB)*

Mencampurkan 3 g bubuk TSB dengan 100 ml akuades. Campuran diaduk hingga homogen dan dipanaskan diatas hot plate. Medium TSB dituangkan ke beberapa tabung reaksi dengan masing-masing sebesar 10 ml. Menutup tabung reaksi menggunakan alumunium foil dan dililit dengan *wrapping*. Medium distrerilkan

menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15-20 menit.

3.5.5.3 Pembuatan medium *Tryptic Soy Agar (TSA)*

Mencampurkan 4 g bubuk TSA dengan 100 ml akuades dan dipanaskan dengan menggunakan hot plate sambil diaduk hingga media benar-benar larut. Menuangkan medium TSA pada beberapa tabung reaksi dengan volume masing-masing sebanyak 12 ml. Tabung kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan dililit dengan *wrapping*. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15-20 menit. Medium TSA adalah medium yang digunakan sebagai medium tumbuh bakteri.

3.5.6 Purifikasi isolat bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* strain GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Purwokerto ditanam pada medium selektif GSP dalam cawan dan diinkubasi selama 1 x 24 jam. Hasil purifikasi diperoleh biakan murni bakteri *A. hydrophila* yang ditandai dengan adanya koloni berwarna kuning (Lukystiowati & Kurniasih, 2011).

Koloni dari masing-masing strain bakteri *A. hydrophila* yang terpilih di kultur pada medium TSA sebanyak 3 tabung, 1 tabung untuk *stock culture* dan 2 tabung untuk *working culture*. Semua pekerjaan dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow (LAF)*.

3.5.7 Penentuan jumlah bakteri uji *A. hydrophila* menggunakan metode total plate count (TPC)

Penentuan jumlah sel bakteri uji dilakukan dengan metode TPC atau hitungan cawan. Metode tersebut digunakan untuk menghitung jumlah koloni sel bakteri yang tumbuh pada setiap taraf pengenceran menggunakan akuades steril. Menyiapkan 7 buah tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran kultur bakteri 10^{-1} sampai 10^{-7} . Tingkat pengenceran yang digunakan untuk perhitungan koloni adalah pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} . Setiap pengenceran diambil 1 ml untuk ditanam secara *pour plate* pada media TSA dalam cawan Petri. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan menggunakan alat *Colony counter*. Jumlah koloni bakteri yang digunakan yaitu 30-300 koloni bakteri. Jumlah koloni bakteri yang kurang dari 30 dan lebih dari 300 tidak dapat digunakan karena secara statistik hitungan tersebut tidak dapat dipercaya. Jumlah organisme per ml biakan dikalkulasikan dengan cara mengalikan jumlah koloni yang terhitung dengan faktor pengencerannya (Hadioetomo, 1993).

3.5.8 Pembuatan konsentrasi ekstrak daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa*

Langkah pertama dalam membuat konsentrasi masing-masing dari ekstrak metanol dan n-heksana daun dan batang *R. stylosa*. Menimbang ekstrak metanol daun dan batang masing-masing sebanyak 1,5 g yang kemudian dilarutkan menggunakan akuades sampai 5 ml untuk konsentrasi 30%, untuk konsentrasi 20% mengambil 1,33 ml dari konsentrasi 30% yang

kemudian dilarutkan dengan aquades sampai 2 ml, dan konsentrasi 10% mengambil 1 ml dari konsentrasi 30% yang kemudian dilarutkan dengan aquades sampai 2 ml, dan untuk konsentrasi 0% sebagai kontrol dengan menggunakan aquades saja. Ekstrak n-heksan daun dan batang masing-masing ditimbang sebanyak 1,2 g yang kemudian dilarutkan dengan 20 tetes n-heksan dan beberapa tetes larutan DMSO 10% sampai 4 ml untuk konsentrasi 30%, untuk konsentrasi 20% mengambil dari konsentrasi 30% sebanyak 1,33 ml yang dilarutkan dengan pelarut DMSO 10% sampai 2 ml, dan untuk konsentrasi 10% mengambil dari konsentrasi 30% sebanyak 0,67 ml yang dilarutkan dengan pelarut DMSO 10% sampai 2 ml, dan untuk konsentrasi 0% menggunakan pelarut DMSO 10% saja. Pengerjaan dari pembuatan masing-masing konsentrasi secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dan untuk menghomogenkan masing-masing konsentrasi dengan cara divortex.

3.5.9 Uji daya hambat ekstrak daun dan batang tumbuhan mangrove *R. stylosa* terhadap bakteri *A. hydrophila* strain GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04

3.5.9.1 Uji daya hambat ekstrak metanol daun *R. stylosa*

Langkah yang dilakukan yaitu menumbuhkan biakan bakteri *A. hydrophila* strain GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04 pada medium TSB, yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kepadatan jumlah bakteri strain tersebut ditentukan sebanyak 10⁷ cfu/ml. Medium TSA 25 ml dicairkan, kemudian menuangkan medium pada cawan petri yang sudah berisi 0,1 ml biakan strain bakteri tertentu campuran

dihomogenkan dengan cara digoyang membentuk angka delapan dan didiamkan sampai memadat. Mengulangi pekerjaan tersebut untuk semua strain-strain bakteri yang telah ditetapkan. Meneteskan ekstrak metanol daun dan batang *R. stylosa* pada 3 buah kertas Watsman 6 mm steril untuk masing-masing konsentrasi 0%, 10%, 20% dan 30% dan meneteskan aquadest steril ke 1 buah kertas watsman steril yang lain. Kertas Watsman di letakkan di permukaan medium biakan bakteri strain tertentu. Perlakuan diulang 3 kali pekerjaan tersebut diulang untuk semua biakan strain bakteri yang tersedia. Semua biakan diinkubasi di inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Mengamati dan mengukur zona hambat yang terbentuk disekitar kertas Watsman menggunakan jangka sorong.

3.5.9.2 Uji daya hambat ekstrak n-heksan daun *R. stylosa*

Langkah yang dilakukan yaitu menumbuhkan biakan bakteri *A. hydrophila* strain GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04 pada medium TSB, yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kepadatan jumlah bakteri strain tersebut ditentukan sebanyak 10⁷ cfu/ml. Medium TSA 25 ml dicairkan, kemudian menuangkan medium pada cawan petri yang sudah berisi 0,1 ml biakan strain bakteri tertentu campuran dihomogenkan dengan cara digoyang membentuk angka delapan dan didiamkan sampai memadat. Mengulangi pekerjaan tersebut untuk semua strain-strain bakteri yang telah ditetapkan. Meneteskan ekstrak n-heksan daun *R. stylosa* pada 3 buah kertas Watsman 6 mm steril untuk masing-masing konsentrasi 0%, 10%, 20% dan 30% dan meneteskan DMSO 10%

steril ke 1 buah kertas watsman steril yang lain untuk kontrol. Kertas Watsman di letakkan di permukaan medium biakan bakteri strain tertentu. Perlakuan diulang 3 kali pekerjaan tersebut diulang untuk semua biakan strain bakteri yang tersedia. Semua biakan diinkubasi di inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Mengamati dan mengukur zona hambat yang terbentuk disekitar kertas Watsman menggunakan jangka sorong.

3.5.9.3 Uji daya hambat ekstrak metanol batang *R. stylosa*

Langkah yang dilakukan yaitu menumbuhkan biakan bakteri *A. hydrophila* strain GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04 pada medium TSB, yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kepadatan jumlah bakteri strain tersebut ditentukan sebanyak 10⁷ cfu/ml. Medium TSA 25 ml dicairkan, kemudian menuangkan medium pada cawan petri yang sudah berisi 0,1 ml biakan strain bakteri tertentu campuran dihomogenkan dengan cara digoyang membentuk angka delapan dan didiamkan sampai memadat. Mengulangi pekerjaan tersebut untuk semua strain-strain bakteri yang telah ditetapkan. Meneteskan ekstrak metanol batang *R. stylosa* pada 3 buah kertas Watsman 6 mm steril untuk masing-masing konsentrasi 0%, 10%, 20% dan 30% dan meneteskan aquadest steril ke 1 buah kertas watsman steril yang lain. Kertas Watsman di letakkan di permukaan medium biakan bakteri strain tertentu. Perlakuan diulang 3 kali pekerjaan tersebut diulang untuk semua biakan strain bakteri yang tersedia. Semua biakan diinkubasi di inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

Mengamati dan mengukur zona hambat yang terbentuk disekitar kertas Watsman menggunakan jangka sorong.

3.5.9.4 Uji daya hambat ekstrak n-heksan batang *R. stylosa*

Langkah yang dilakukan yaitu menumbuhkan biakan bakteri *A. hydrophila* strain GB-01, GJ-01, GK-01, GL-01, GL-02, dan GPI-04 pada medium TSB, yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kepadatan jumlah bakteri strain tersebut ditentukan sebanyak 10⁷ cfu/ml. Medium TSA 25 ml dicairkan, kemudian menuangkan medium pada cawan petri yang sudah berisi 0,1 ml biakan strain bakteri tertentu campuran dihomogenkan dengan cara digoyang membentuk angka delapan dan didiamkan sampai memadat. Mengulangi pekerjaan tersebut untuk semua strain-strain bakteri yang telah ditetapkan. Meneteskan ekstrak n-heksan batang *R. stylosa* pada 3 buah kertas Watsman 6 mm steril untuk masing-masing konsentrasi 0%, 10%, 20% dan 30% dan meneteskan DMSO 10% ke 1 buah kertas whatsmann steril yang lain sebagai kontrol. Kertas Watsman di letakkan di permukaan medium biakan bakteri strain tertentu. Perlakuan diulang 3 kali pekerjaan tersebut diulang untuk semua biakan strain bakteri yang tersedia. Semua biakan diinkubasi di inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Mengamati dan mengukur zona hambat yang terbentuk disekitar kertas Watsman menggunakan jangka sorong.

3.5.10 Parameter yang diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian adalah aktivitas antibakteri ekstrak tanaman *R. stylosa* yang ditentukan berdasarkan satuan diameter

(cm) zona hambatan (zona bening) di sekitar kertas watsman (metode Kirby-Bauer) yang berdiamter 6 mm pada media yang telah diinokulasi dengan strain bakteri *A.hydrophila*.

3.5.11 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh berdasarkan perhitungan diameter zona hambat menggunakan analisis Nonparametrik (Kruskal-Wallis) dengan taraf kepercayaan 95%.