

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bulu Babi yang didapat dari pantai pasir putih Situbondo, Jawa timur. Bulu Babi diambil gonad dimasukkan ke dalam plastik kemudian dimasukkan kedalam coolbox lalu diberi es balok dan coolbox ditutup dengan lakban untuk mempertahankan suhu rendah selama transportasi dan bulu babi tetap segar sampai ditempat tujuan.

Bahan-bahan lain yaitu biakan murni bakteri *Eschericia Coli* dan *Staphylococcus Aureus* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. N-Heksan , MHA (*Mueller Hinton Agar*), NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), DMSO (Dimetil sulfoksida), kertas cakram (*blank disk*) dengan diameter 6 mm, plat silika gel 60 GF₂₅₄ MERCK kertas saring whattman no.1, antibiotic Tetrasiklin, alkohol 70%, cotton swab steril, akuades, aluminium foil, kapas, kertas label NaOH 1M, CuSO₄ 0,01 M.

3.1.2 Alat Penelitian

Adapun alat alat yang digunakan dalam ekstraksi adalah corong, botol plastik, gelas ukur 100 ml, spatula, rotary vacuum evaporator merek Buchi, neraca analitik dan botol vial. Peralatan yang digunakan untuk uji cakram yaitu autoklaf, *laminar air flow*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikro pipet, jarum ose, cawan petri, waterbath, inkubator, pinset, triangle, bunsen, vortex mixer, korek api,dan jangka sorong atau penggaris. Alat alat untuk identifikasi senyawa

bioaktif yaitu hot plate, tabung reaksi, beaker glass, timbangan analitik, pipet tetes, pipet volume, FTIR.

3.2 Metode penelitian

Pada penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan pendekatan kuantitatif. Dikemukakan Sugiono (2014), penelitian dengan menggunakan metode deskriptif pada umumnya dilakukan untuk mengetahui keberadaan variabel, baik hanya satu variabel atau lebih tanpa membuat perbandingan atau menghubungkan dengan variabel lain. Menurut Suryana (2010), metode yang digunakan juga untuk mencari unsur-unsur, ciri-ciri, sifat-sifat suatu fenomena. Metode ini dimulai dengan mengumpulkan data, menganalisis data dan menginterpretasikannya. Dilakukan dengan studi kasus, studi komperatif, analisis dokumenter.

Adapun variabel bebas dan variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

- Variabel bebas : ekstrak bulu babi (*Diadema setosum*) dengan pelarut n-Heksan,
- Variabel terikat : uji antibakteri daya hambat, dan identifikasi senyawa aktif dengan FT-IR.

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yakni penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi ekstraksi Bulu Babi (*Diadema setosum*) dengan metode maserasi menggunakan pelarut n-Heksan, kemudian dilakukan penelitian utama yaitu uji daya hambat bakteri dengan metode cakram. Identifikasi senyawa kimia dalam sampel dilakukan dengan uji FT-IR.

3.2.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 7 perlakuan. Dimana masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Adapun rancangan penelitian pendahuluan dan utama untuk uji antibakteri dengan cakram dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Desain Rancangan Penelitian

Perlakuan		Ulangan ke-1	Ulangan ke-2	Ulangan ke-3	Ulangan ke-4
Penggunaan	1000 ppm	A1a1	A1a2	A1a3	A1a4
Konsentrasi	2000 ppm	A2a1	A2a2	A2a3	A2a4
Ekstrak	4000 ppm	A3a1	A3a2	A3a3	A3a4
	8000 ppm	A4a1	A4a2	A4a3	A4a4
Kontrol Positif (Tetrasiklin)		B1b1	B1b2	B1b3	B1b4
Kontrol negatif (pelarut DMSO 10%)		C1c1	C1c2	C1c3	C1c3
Pelaru n-Heksan		D1d1	D1d2	D1d3	D1d4

Keterangan perlakuan :

A1a1= Konsentrasi ekstrak 1000 ppm
 A2a1= Konsentrasi ekstrak 2000 ppm
 A3a1= Konsentrasi ekstrak 4000 ppm
 A4a1= Konsentrasi ekstrak 8000 ppm
 B1b1= Kontrol Tetrasiklin
 C1c1= Kontrol DMSO 10%
 D1d1= Pelarut n-Heksan

3.3 Prosedur Penelitian Pendahuluan

3.3.1 Ekstraksi Bulu Babi (*Diadema Sitosum*) (Hasan et al., 2015)

Sampel Bulu Babi (*Diadema setosum*) diperoleh dari nelayan pantai pasir putih Situbondo , Jawa timur. Bulu Babi (*Diadema setosum*) dibersihkan dari kotoran kemudian dilepaskan dari cangkangnya diambil Gonad, lalu ditimbang sebanyak 600 g dan dihaluskan dengan menggunakan blender (Hasan et al.,

2015). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi yaitu merendam Bulu Babi dengan pelarut n-Heksan p.a 1:2 (b/v) ditutup *aluminium foil*. Maserasi dilakukan selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Hasil maserasi selanjutnya disaring dengan kertas saring whattman no.01 sehingga didapatkan filtrat dan residu. Filtrat selanjutnya di uapkan dengan rotary evaporator pada suhu 50⁰C sampai n-Heksan menguap. Hasil ekstrak kasar ditimbang lalu disimpan dalam lemari pendingin untuk diuji selanjutnya.

3.4 Penelitian Utama

3.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri *Diadema setosum* terhadap Bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Mpila,2012)

Uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak kasar Bulu Babi (*Diadema setosum*). Tahap awal yang dilakukan adalah alat-alat dalam pengujian aktivitas antibakteri di sterilkan terlebih dahulu. Alat-alat disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit, pinset dibakar dengan pembakaran diatas bunsen dan media disterilkan diautoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Mpila, 2012).

3.4.2 Pembuatan media padat, cair dan Penyegaran Bakteri uji

Serbuk media NA ditimbang sebanyak 2 gr dilarutkan dalam 100 ml akuades dalam erlenmeyer dan dipanaskan hingga larut. Lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah steril tabung dimiringkan dan didiamkan hingga membentuk agar miring. Sebanyak 1 ose bakteri uji digoreskan pada media agar miring setelah itu diinkubasi selama 18-24 jam.

Tahap awal dilakukan peremajaan bakteri uji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada media *Nutrient Broth*. Nutrien Broth ditimbang sebanyak 0,9 g dilarutkan dalam 100 ml akuades, selanjutnya dipanaskan hingga

mendidih. NB dipipet sebanyak 9 ml ke dalam tabung reaksi dan masing masing ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil. Sebelum digunakan, media di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu media didinginkan ditempat steril pada suhu ruang.

Media padat yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media MHA ditimbang sebanyak 21, 28 g dilarutkan dalam 560 ml akuades dalam beaker glass 1000 ml. Lalu dipanaskan hingga mendidih kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.3 Persiapan suspensi bakteri

Sebanyak 3-4 ose bakteri uji dimasukkan ke dalam media cair NB . setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah itu diukur kekeruhannya secara turbidimetri dengan menggunakan spektrofotometri UV VIS pada panjang gelombang 625 nm (OD_{625}) dan disesuaikan dengan standar kekeruhan Mc Farland.

3.4.4 Pembuatan konsentrasi ekstrak uji

Penelitian ini menggunakan konsentrasi ekstrak uji yaitu 1000 ppm, 2000 ppm, 4000 ppm, 8000 ppm dengan pelarut dimetilsulfoksida (DMSO 10%).

3.4.5 Kontrol positif dan Kontrol negatif

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik tetrasiklin dengan konsentrasi 500 ppm. Sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan pelarut DMSO 10%.

3.4.6 Pelarut n-Heksan

N-heksan digunakan sebagai pembanding dari hasil daya hambat ekstrak Bulu Babi (*Diadema setosum*).

3.4.7 Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode cakram

Pengujian aktivitas antibakteri yaitu sebanyak 1ml suspensi bakteri yang telah diinokulasikan di media Nutrient Broth dimasukkan kedalam cawan petri steril, kemudian ditambah 20 ml media MHA steril. Lalu cawan petri digoyangkan membentuk angka 8 sampai media dan suspensi bakteri homogen. Setelah agar menjadi padat lalu cawan petri ditandai dengan cara membuat diagram untuk 6 bagian dengan perlakuan kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan ekstrak masing-masing (1000 ppm, 2000 ppm, 4000 ppm dan 8000 ppm). Kertas cakram diletakkan diatas lapisan MHA didalam cawan petri padat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas antibakteri yang ditentukan dengan mengukur zona hambatan (dalam milimeter) yang ditandai dengan adanya zona bening yang terbentuk disekililing kertas cakram.

3.5 Identifikasi Senyawa Aktif

3.5.1 Pengujian *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FT-IR) (Ilhamsyah, 2010)

Pengujian spektroskopi FT-IR dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang, Malang. Uji spektroskopi FT-IR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsional dari senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak n-heksan Bulu babi. Sebelum perlakuan, sampel padatan larut air sebanyak 20 mg dicampurkan dengan serbuk KBr, digerus pada lumping agate hingga tercampur rata dengan diambil sedikit kemudian masukan ke dalam cakram dan dipress dengan alat *press holder*. Setelah terbentuk film tipis, cakram KBr dimasukan pada KBr *disc*

holder dan spektrum di rekam pada range 400 – 400 cm^{-1} pada resolusi 8 dengan FTIR spektrofotometer. Hasilnya dengan spektrum barley >95%.

3.6 Analisa Data

Pengolahan data dalam hasil penelitian ini untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur dengan menggunakan *software SPSS 16.0* dan analisa data menggunakan ANOVA dengan selang kepercayaan 95%, apabila berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut Tukey