

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada ekstraksi adalah pisau, nampan, timbangan analitik, blender, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 100 ml, spatula, sendok, dan corong. Peralatan yang digunakan pada uji antimikroba, yaitu pipet volum 10 ml, pipet serologis 1 ml, botol vial 3 ml, mikropipet, jarum ose, cawan petri, spatula, sendok, corong, *autoclave*, *waterbath*, *incase*, *stirer*, *microbiuret*, jangka sorong, penggaris, pinset, dan bunsen. Peralatan dalam partisi adalah kolom kromatografi 50 cm. Peralatan karakterisasi Bioaktif, yaitu spektrofotometer UV-Vis 1601 Shimadzu, spektrofotometer FT-IR Shimadzu, tabung reaksi, dan pipet tetes.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah mangrove *Rhizophora mucronata* yang diambil dari muara Sungai Porong, Dusun Tegal Sari, Desa Kupang, Kecamatan Jabon, Kabupaten Sidoarjo. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Bahan kimia yang digunakan adalah methanol (MeOH), kloroform (CHCl₃), etil asetat, n-hexan, aquadest, Mueller-Hinton Agar Merck, Na-fis 0,9%, larutan Dimetil sulfoksida (DMSO) 10%, Silica gel 60 F₂₅₄, alkohol 70% dan *blankdisk*. Bahan pembantu yang digunakan adalah kapas, aluminium foil, kertas saring, *cotton swab*, spirtus, pasir, dan kertas label.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada pelaksanaan Skripsi ini adalah metode eksploratif dan deskriptif. Metode penelitian ini bersifat eksplorasi, karena bertujuan untuk memberikan gagasan, wawasan, serta pemahaman sekaligus pemecahan masalah atas permasalahan yang dihadapi oleh peneliti.

Menurut Surakhmad (1994), metode deskriptif merupakan metode penyelidikan yang menuturkan dan mengklasifikasikan data yang diperoleh dari berbagai teknik pengambilan data. Tujuan dari pelaksanaan metode deskriptif adalah untuk memaparkan secara sistematis, faktual, dan akurat mengenai fakta serta sifat dari suatu populasi tertentu. Pengumpulan data sesuai dengan tujuan dan secara rasional kesimpulan diambil dari data yang berhasil dikumpulkan.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian karakterisasi antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dari mangrove *Rhizophora mucronata* secara umum terbagi menjadi delapan tahap, yaitu persiapan bahan, ekstraksi, pengujian antimikroba dari ekstrak, partisi, pengujian antimikroba dari partisi, fraksinasi, pengujian antimikroba dari fraksi, dan karakterisasi bioaktif, dengan skema penelitian seperti pada Gambar 14.

3.3.1 Persiapan Bahan

Mangrove *Rhizophora mucronata* diambil secara acak dari daerah muara sungai Porong yang teraliri buangan lumpur Lapindo, tepatnya di Dusun Tegal Sari, Desa Kupang, Kecamatan Jabon, Kabupaten Sidoarjo. Setiap bagian pohon mangrove, antara lain daun, akar, batang, kulit, buah dan bunga, diambil sebanyak 1000 gr. Selanjutnya, dikeringkan dibawah sinar matahari selama 1 minggu untuk memaksimalkan penguapan kadar air sampel. Setelah

dikeringkan, sampel ditimbang untuk mengetahui rendemen sampel yang telah kering. Selanjutnya, sampel dihaluskan menggunakan blender.

3.3.2 Ekstraksi

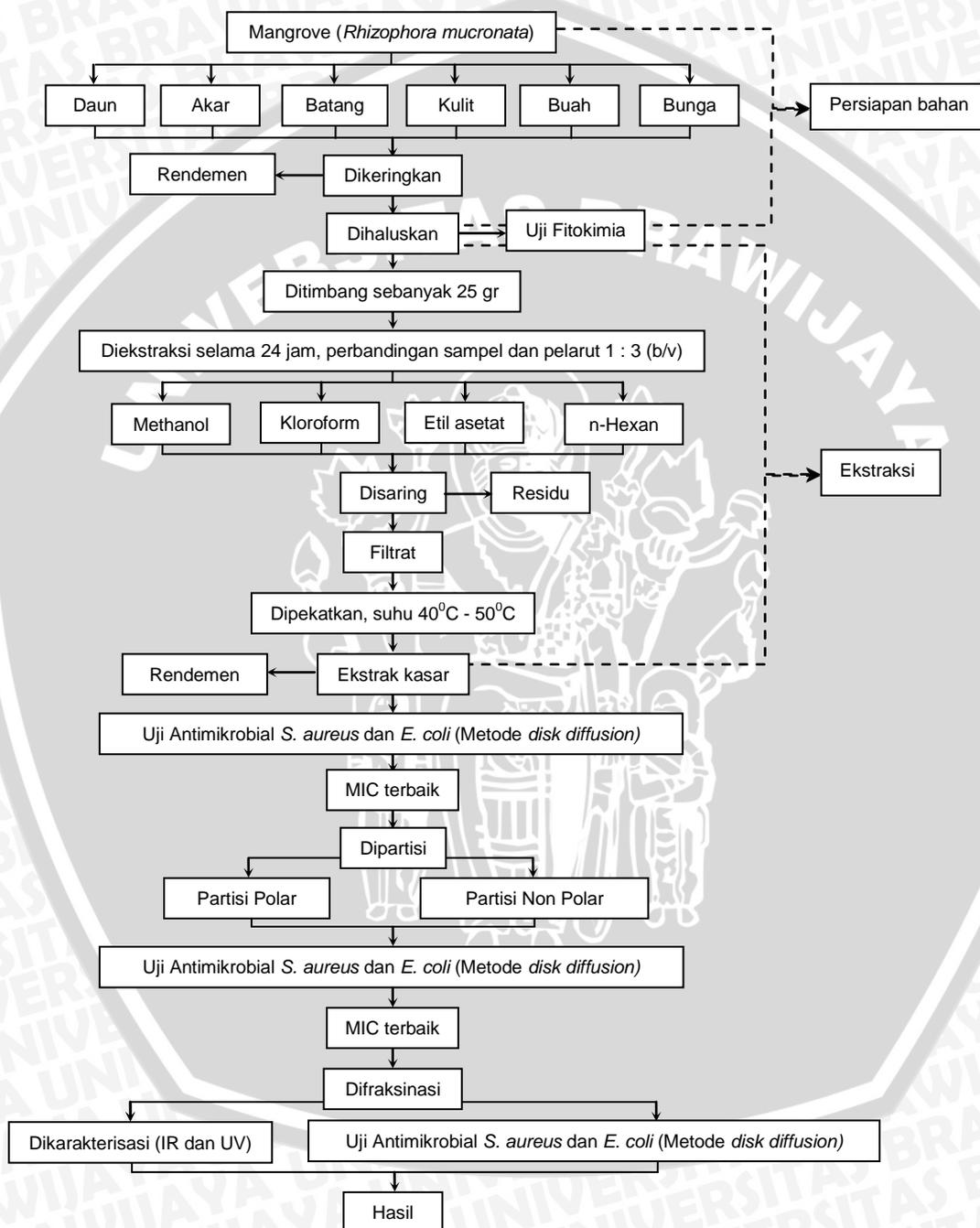
Metode ekstraksi yang digunakan ialah maserasi. Sampel mangrove *Rhizophora mucronata* halus ditimbang sebanyak 25 gr. Kemudian dimasukkan ke dalam 4 jenis pelarut yang berbeda tingkat polaritasnya, yaitu methanol, kloroform, etil asetat, dan hexan. Perbandingan antara sampel dan pelarut adalah 1 : 3. Selanjutnya, larutan dibiarkan selama 24 jam, pada suhu ruang (27°C). Setiap 2 jam sekali, larutan digoyang-goyang untuk memaksimalkan senyawa yang terekstraksi. Setelah perendaman, larutan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan bentuk fase padat dan cair. Filtrat atau hasil fase cair ditimbang beratnya untuk mengetahui rendemen hasil ekstraksi. Filtrat yang dihasilkan diuapkan kembali, sehingga diperoleh stok ekstrak mangrove *Rhizophora mucronata*. Stok ekstrak mangrove ditimbang beratnya untuk mengetahui rendemen hasil penguapan.

3.3.3 Pengujian Antimikroba (Metode Kirby-Bauer)

Pengujian ketahanan antimikroba pada penelitian ini dibedakan menjadi 2 berdasarkan kemurnian senyawa bioaktifnya, yaitu pengujian antimikroba I dengan menggunakan ekstrak kasar mangrove *Rhizophora mucronata*, dan pengujian antimikroba II dengan menggunakan ekstrak murni bioaktif mangrove *Rhizophora mucronata*.

Prosedur pengujian antimikroba penelitian ini menggunakan metode cawan agar difusi Kirby-Bauer. Prinsip uji ini adalah, pada lempeng agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji ditempelkan cakram kertas yang

berisi berbagai antibiotik. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994).



Gambar 14. Skema Kerja Penelitian “Karakterisasi Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dari Ekstrak Mangrove *Rhizophora mucronata*.”

Lempeng agar yang digunakan adalah media Mueller-Hinton Agar (MHA). 38 gr MHA dilarutkan ke dalam 1 L aquades. Kemudian, dipanaskan selama 1 menit sambil terus diaduk untuk melarutkan bubuk MHA. Larutan MHA disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121^oC, tekanan 1 atm, selama 15 menit. Selanjutnya, media MHA dituang ke dalam cawan petri steril dengan ketinggian 4 mm (60-70 mL media untuk cawan berdiameter 150 mm dan 25-30 mL untuk cawan berdiameter 100 mm). Didinginkan pada suhu ruang.

Media MHA yang telah beku disemai dengan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Kepadatan bakteri yang digunakan sesuai dengan standart kepadatan McFarland 0,5 yaitu 10⁸ koloni/mL. Lalu, dibiarkan mengering selama 5 menit.

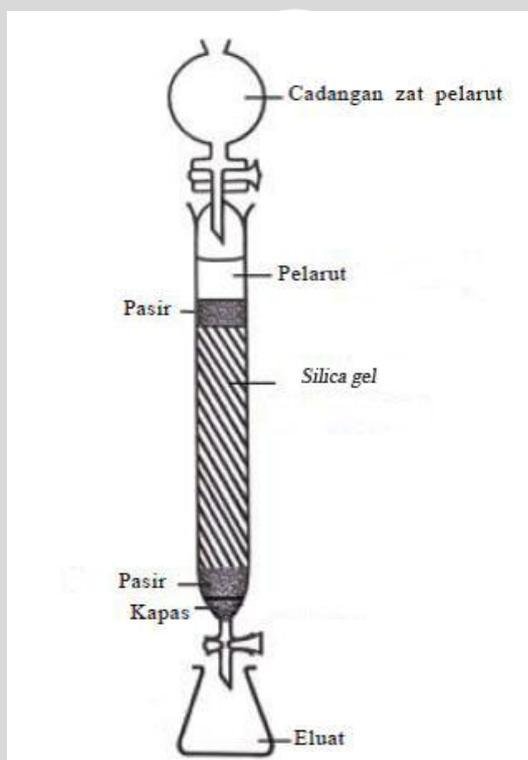
Blankdisk dengan diameter 5,2 mm direndam dalam larutan antibiotik, yaitu ekstrak mangrove dengan 4 konsentrasi berbeda (0,1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm), selama ± 1 menit. Kemudian, *blankdisk* yang telah direndam dalam larutan antibiotik, ditempelkan pada lempeng MHA. Inkubasi pada suhu 27^oC, selama 24 jam. Diamati dan diukur zona penghambatan yang terdapat pada masing-masing *disk*. Pengukuran zona penghambatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar *blankdisk* dengan jangka sorong. Bandingkan diameter zona penghambatan yang terjadi pada setiap ekstrak bagian mangrove.

3.3.4 Metode Pemisahan / Partisi (Kromatografi Kolom)

Partisi atau pemisahan kandungan senyawa bioaktif mangrove dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Kolom. Kromatografi kolom merupakan metode untuk pemisahan campuran. Menurut Sastrohamidjojo (2007), prinsip kerja kromatografi kolom ialah kolom pemisah diisi dengan

penyerap zat padat seperti alumina (fasa tetap) dan dialiri dengan pelarut seperti benzena (fasa bergerak).

Metode kromatografi kolom yang digunakan sesuai metode Hayani (2007) yang dimodifikasi. Pertama dilakukan pengisian kolom. Bagian bawah kolom diisi dengan sedikit kapas dan pasir. Dibuat bubur *silica gel* dengan mencampur *silica gel*. Kemudian dimasukkan bubur *silica gel* 70-230 mesh, sambil diaduk agar tidak terdapat rongga udara dalam kolom. Panjang timbunan bubur *silica gel* dalam kolom \pm 15 cm. Bentuk rancangan kromatografi kolom seperti Gambar 15.



Gambar 15. Rancangan kromatografi kolom ekstrak mangrove *R. mucronata* (Hayani, 2007).

Setelah persiapan dengan pengisian kolom, dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Mula-mula kromatografi kolom dialirkan ekstrak mangrove *R. mucronata*, kemudian kran kromatografi dibuka. Ekstrak akan

meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Selanjutnya, dimasukkan pereaksi terus menerus sambil kran kolom dibuka. Pereaksi yang digunakan dalam pemisahan ini adalah eluen campuran polar dan non polar dengan perbandingan 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Fraksi yang terpisah ditampung dalam botol vial 3 ml sampai seluruh ekstrak terpisahkan.

3.3.5 Karakterisasi Bioaktif Mangrove *R. mucronata*

3.3.5.1 Pengujian Fitokimia

Pengujian fitokimia dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Departemen Pertanian, Bogor. Pengujian fitokimia berfungsi untuk mengidentifikasi kandungan fitokimia mangrove *Rhizophora mucronata*. Kandungan fitokimia yang diidentifikasi dalam penelitian ini adalah yang memiliki kemampuan sebagai anti bakteri, yaitu alkaloid, tannin, saponin, fenolik, flavonoid, triterfenoid, steroid, dan glikosida.

Uji alkaloid dilakukan menurut metode Culvenor (1963), yaitu sampel halus dilarutkan dalam kloroform. Kemudian ditambahkan asam sulfat dan pereaksi Meyer. Keberadaan alkaloid ditandai dengan munculnya endapan putih.

Uji tannin, flavonoid, dan glikosida dilakukan menurut metode Harbourne (2006). Pada uji tannin, sampel dididihkan. Kemudian disaring dan ditambahkan FeCl_3 . Terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tannin.

Pada uji flavonoid, sampel direndam dalam metanol dan ditambahkan H_2SO_4 . Selanjutnya diamati, terbentuknya warna merah menunjukkan kandungan flavonoid.

Pada uji glikosida sampel ditambahkan etanol 80%. Kemudian dicuci dengan hexan, hingga larutan hexan tidak berwarna. Ditambahkan FeCl_3 dan ditetesi asam sulfat pekat. Keberadaan kandungan glikosida ditandai dengan terbentuknya warna merah kecokelatan.

Uji saponin, triterfenoid, dan steroid dilakukan menurut Simes (1995), yaitu sampel halus dididihkan dengan etanol dan diuapkan. Kemudian ditambahkan kloroform, maka akan terbentuk lapisan air dan kloroform. Dipisahkan antara lapisan air dan kloroform. Lapisan air dikocok kuat-kuat, sehingga terbentuk busa yang menunjukkan adanya saponin. Sedangkan lapisan kloroform ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Diamati perubahan warnanya. Pembentukan warna merah menunjukkan adanya terpenoid dan warna biru atau hijau menunjukkan adanya steroid.

3.3.5.2 Pengujian Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-Vis)

Pengujian spektrofotometer UV-Vis dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang. Pengujian ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi sampel yang diamati, kemudian hasilnya digunakan untuk menganalisa karakteristik bioaktif ekstrak mangrove *R. mucronata*. Di dalam analisa kuantitatif dengan metode spektrofotometri, panjang gelombang sinar yang digunakan harus dipilih terlebih dahulu, agar komponen yang dianalisa menyerap sinar tersebut semaksimal mungkin. Jika bahan yang dianalisa mempunyai warna tertentu, maka warna komplementernya merupakan bagian panjang gelombang yang sesuai untuk analisa tersebut (Apriyantono *et al.*, 1989).

Pengujian ini menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Menurut Fatimah, *et. al.* (2009), cara analisa dengan alat spektrofotometer UV-Vis adalah mula-mula alat dinolkan dengan cara larutan blanko dimasukkan ke dalam dua buah kuvet lalu ditekan “*back correct*” dan “*run*”. Setelah alat dalam kondisi nol, salah satu blanko dikeluarkan dan diganti dengan ekstrak mangrove *R. mucronata*. Kemudian, diatur panjang gelombang antara 200 nm – 800 nm. Maka akan muncul tampilan spektrum panjang gelombang dari ekstrak mangrove *R. mucronata*.

3.3.5.3 Pengujian Spektrofotometer *Fourier transform infrared spectrometer* (FT-IR)

Pengujian spektrofotometer FT-IR dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang. Uji spektrofotometer FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsional dari bioaktif ekstrak mangrove *R. mucronata*. Spektrofotometer FT-IR merupakan merupakan spektroskopi *infrared* yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk mendeteksi dan analisis hasil spektrumnya. Spektrum *infrared* dihasilkan dari pentransmisian cahaya yang melewati sampel. Spektrum *infrared* yang diperoleh, kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Analisis gugus fungsi sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum *infrared* menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui (Anam, *et. al.*, 2007).

Menurut Sastrohamidjojo (2001), daerah pada spektrum infrared diatas 1500 cm^{-1} menunjukkan pita spektrum atau gugus-gugus fungsi dalam molekul kimia. Sedangkan daerah dibawah 1500 cm^{-1} menunjukkan daerah sidik jari.