

III. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *autoclave*, oven, kulkas, *petridisc*, erlemeyer, *baker glass*, gelas ukur, bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, hot plate, pipet tetes, timbangan digital, timbangan sartorius, vortex, mikropipet, nampan, spektrofotometer, *washing bottle*, masker, sarung tangan, pipet volum, jarum ose, *cotton swap*, botol sampel dan LAF. Gambar dari peralatan penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L.), aquades, etanol 70%, tisu, aluminium foil, kapas, kertas label, inokulan bakteri *Aeromonas hydrophila*, media TSA (*Tryptone Soya Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), *blank disk*, aquades murni, antibiotik chloramphenicol, dan DMSO 10%.

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati / diukur dampaknya. (Jaedun, 2011).

3.2.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan

yang seragam sehingga kondisi lingkungan tempat penelitian dalam keadaan sama (Sastrosupadi, 2002). Rumus perhitungan RAL adalah sebagai berikut.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

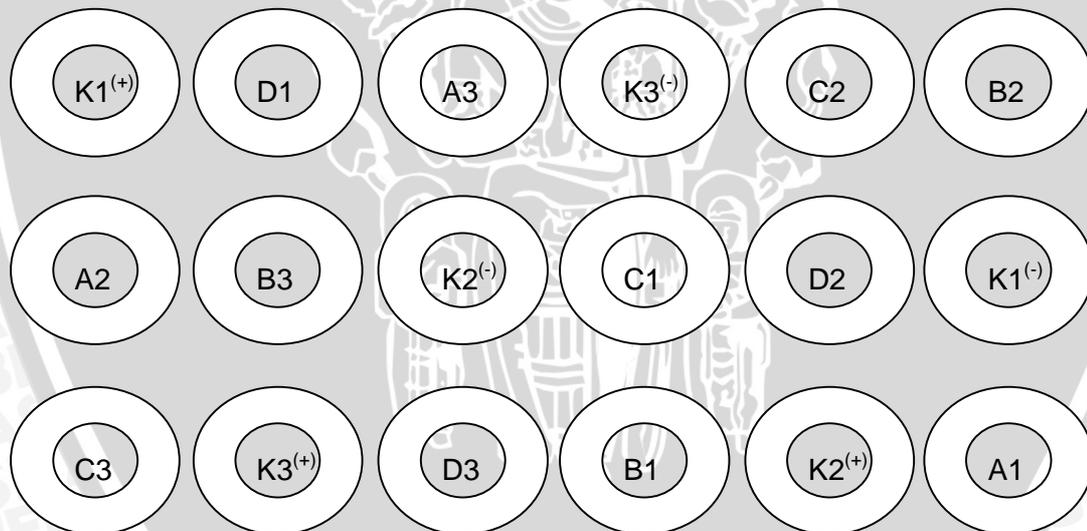
Y_{ij} = Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Nilai tengah umum

T_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = Pengaruh gallat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Rancangan Percobaan yang digunakan yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 1 kontrol yang masing-masing dilakukan 3 kali ulangan. Denah penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah (Layout) Rancangan Penelitian

Keterangan :

Kontrol (+) : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi Antibiotik Chloramphenicol 10 %,

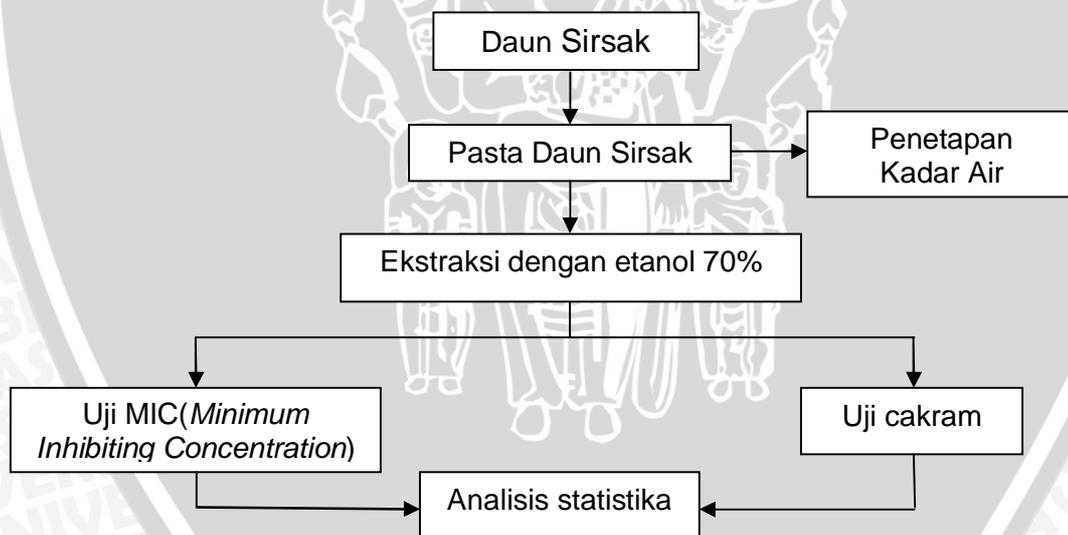
Kontrol (-) : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi larutan DMSO 10%,

- Perlakuan A : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L.*) dengan dosis 8 ppm,
- Perlakuan B : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L.*) dengan dosis 12 ppm,
- Perlakuan C : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L.*) dengan dosis 16 ppm,
- Perlakuan D : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L.*) dengan dosis 20 ppm,
- Ulangan : 1, 2 dan 3.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

Persiapan hingga pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada skema tahapan penelitian (Gambar 4.) berikut.



Gambar 4. Skema Tahapan Penelitian.

a. Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi adalah setiap proses baik fisika, kimia dan mekanik yang membunuh semua bentuk kehidupan terutama mikroorganisme. Suatu alat atau bahan dikatakan steril apabila alat atau bahan tersebut bebas dari mikroba, baik dalam bentuk vegetatif ataupun spora.

Tahapan sterilisasi alat dan bahan dengan *autoclave* sebagai berikut.

- Alat-alat yang telah dicuci dan dikeringkan kemudian dibungkus menggunakan kertas koran dan diikat dengan benang,
- Dituang akuades ke dalam *autoclave* hingga bagian elemen pemanas terendam seluruhnya, dibungkus alat dan bahan dengan kertas koran dan dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris,
- Dinyalakan *autoclave* kemudian setelah mencapai tekanan 1 atm, ditunggu selama 15 menit,
- Dimatikan *autoclave* dan ditunggu sampai tekanan menunjukkan 0 atm, lalu dibuka kran uap dan baut penutup *autoclave* secara simetris,
- Diambil alat dan bahan yang sudah disterilkan atau disimpan jika tidak langsung digunakan ke dalam lemari pendingin.

b. Proses pengeringan daun sirsak dan penetapan kadar air.

Daun sirsak yang digunakan, dipilih daun dengan urutan keempat dari pangkal batang. Dalam penelitian ini digunakan 2 kg daun sirsak yang kemudian dilakukan pengeringan selama 7 hari dengan cara dijemur didalam ruangan tertutup. Hal ini dilakukan agar senyawa aktif yang terdapat pada daun sirsak tidak menguap apabila dijemur di bawah sinar matahari. Dari proses pengeringan didapatkan bobot kering daun sirsak (*A. muricata* L.) seberat 800 g. Serbuk daun sirsak diperoleh dengan cara menghaluskan daun sirsak yang sudah kering hingga diperoleh serbuk yang berukuran 80 mesh.

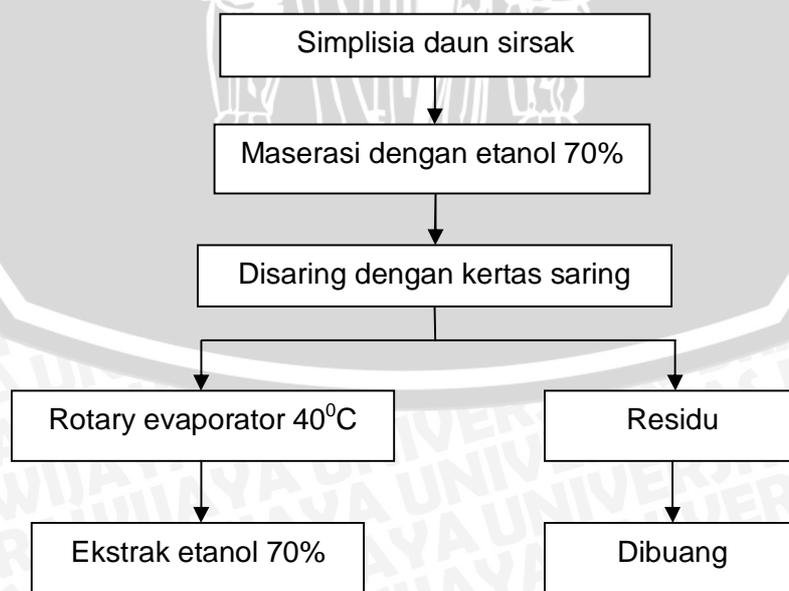
Penentuan kadar air dilakukan dengan pengeringan cawan porselin pada suhu 105 °C selama 30 menit lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang bobotnya. Sebanyak 3 g serbuk daun sirsak dimasukkan dalam cawan dan dipanaskan pada suhu 105 °C selama 3 jam lalu didinginkan dalam desikator

kemudian ditimbang. Pemanasan diulang sampai diperoleh bobot konstan. Kadar air dihitung dengan rumus :

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{Bobot awal (g)} - \text{Bobot setelah dikeringkan (g)}}{\text{Bobot setelah dikeringkan (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{2000 \text{ g} - 800 \text{ g}}{800 \text{ g}} \times 100\% \\ &= \frac{1200 \text{ g}}{800 \text{ g}} \times 100\% = 15\% \end{aligned}$$

c. Proses maserasi daun sirsak dengan menggunakan etanol 70%.

Persiapan sampel ekstrak dari daun sirsak dengan metode maserasi yaitu merendam serbuk daun sirsak kering menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Maserasi dilakukan selama 24 jam sambil sesekali diaduk kemudian disaring. Perendaman residu diulang 2 kali agar komponen bahan aktif pada daun sirsak dapat terambil dengan baik. Maserat yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan menggunakan rotavapor dengan suhu 40°C agar ekstrak tidak kehilangan senyawa aktif yang tidak tahan panas (Restasari 2008). Ekstraksi daun sirsak dapat dilihat pada Gambar 5. berikut.



Gambar 5. Skema Ekstraksi Daun Sirsak.

Dari proses maserasi 800 gr bobot kering (simplisia) daun sirsak dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1,5 liter diperoleh 4 gr senyawa alkaloid dari ekstrak kasar daun sirsak (*Annona muricata* L.).

Perbedaan ekstraksi senyawa alkaloid dengan flavonoid

a. Alkaloid

Alkaloid dapat ditemukan pada biji, daun, ranting dan kulit kayu dari tumbuh-tumbuhan dengan kandungan alkaloid mencapai 10-15%. Alkaloid kebanyakan bersifat racun, tetapi ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan. Alkaloid merupakan senyawa tanpa warna, sering kali bersifat optik aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar (Sabirin, et al.,1994). Suatu cara mengklasifikasi alkaloid adalah didasarkan pada jenis cincin heterosiklik nitrogen yang terikat. Menurut klasifikasi ini alkaloid dibedakan menjadi : piroolidin, piperidin, isoquinolin, quinolin dan indol.

Kebasaan alkaloid menyebabkan senyawa ini mudah terdekomposisi terutama oleh panas, sinar dan oksigen membentuk N-oksida. Jaringan yang masih mengandung lemak, maka dilakukan ekstraksi pendahuluan petroleum eter. Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat non polar yang dapat diekstraksi dengan pelarut seperti : klorofom, etanol dan air.

b. Flavonoid

Senyawa flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C6 - C3 – C6. Susunan tersebut dapat menghasilkan tiga struktur yaitu: 1,3-diarilpropana (flavonoid), 1,2-diarilpropana (isoflavonoid), 2,2-diarilpropana (neoflavonoid). Menurut Markham (1982), flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar karena mempunyai gugus hidroksil yang tak tersulih, atau suatu gula, sehingga flavonoid cukup larut dalam

pelarut polar seperti metanol, butanol dan etil asetat. Flavonoid umumnya terikat pada gula sebagai glukosida dan aglikon flavonoid.

Alasan penggunaan etanol 70% pada proses ekstraksi dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- (1) Etanol 70% merupakan pelarut yang bersifat semi polar artinya dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar dan non polar,
- (2) Dibandingkan dengan menggunakan air, etanol 70% lebih steril untuk digunakan sebagai pelarut,
- (3) Hasil ekstraksi akan bertahan lebih lama dengan menggunakan etanol 70% pada proses maserasi.

d. Pembuatan media agar *Triptic Soya Agar (TSA)*

Menurut Firdausi (2013), tahapan pembuatan media TSA seperti yang di tunjukkan di bawah ini :

- Dilarutkan sebanyak 4,8 gr TSA (untuk 6 cawan petri dengan volume 20 ml) dengan 120 ml akuades ke dalam erlenmeyer,
- Diaduk larutan media di atas *hotplate* hingga mendidih dan berwarna kuning jernih,
- Ditutup erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil kemudian disterilisasi di dalam *autoclave* pada tekanan 1 atm selama 15 menit,
- Dituang media TSA ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 20 ml yang telah diberi label konsentrasi perlakuan sebelumnya,
- Dibiarkan dingin media hingga mencapai suhu 30° C karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas,
- Diletakkan bunsen-bunsen yang menyala dengan posisi mengelilingi media yang sedang didinginkan untuk menghindari kontaminasi pada media,
- Media dapat digunakan apabila sudah dingin dan membeku seperti agar.

e. **Pembuatan media cair *Nutrient Broth* (NB)**

Langkah-langkah pembuatan media NB adalah seperti berikut.

- Dilarutkan sebanyak 0,18 gram NB (untuk 5 tabung reaksi dengan volume 4,5 ml) dengan 50 ml akuades di dalam erlenmeyer,
- Diaduk di atas *hotplate* hingga mendidih lalu dimasukkan ke dalam 5 tabung masing-masing 10 ml dengan menggunakan pipet volumetrik,
- Ditunggalkan tabung reaksi dengan kapas dan aluminium foil kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada tekanan 1 atm selama 15 menit,
- Dibiarkan dingin media yang akan digunakan hingga mencapai suhu 30° C karena bakteri akan mati apabila ditanam pada media yang masih panas,
- Media yang akan digunakan didekatkan pada bunsen agar tidak terkontaminasi.

f. **Cara membuat *stock* bakteri *A. hydrophila* 10⁷ sel/ml**

Prosedur untuk memperoleh bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10⁷ yaitu dengan metode pengenceran berseri. Gambar dari isolat murni (*stock*) bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Langkah-langkah pengenceran berseri seperti berikut.

- Dipersiapkan bakteri *A. hydrophila* yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kepadatan 10⁸ sel/ml,
- Dipersiapkan 2 buah tabung reaksi yang diberi tanda pada kertas label kemudian masing-masing tabung diisi 9 ml akuades,
- Diambil 1 ml bakteri dari stok (kepadatan 10⁸ sel/ml) menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung pertama kemudian di vortex,
- Diambil 1 ml bakteri dari tabung reaksi pertama menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua kemudian di vortex,
- Didapatkan bakteri dengan kepadatan 10⁷ sel/ml.

g. Peremajaan bakteri dengan media agar miring.

Peremajaan bakteri dilakukan agar bakteri yang akan digunakan dapat bertahan 3 bulan lebih lama dibandingkan dengan menggunakan bakteri langsung dari biakan murni nya. Hal ini dikarenakan adanya tambahan nutrisi dari media yang diberikan pada bakteri sehingga mampu bertahan lebih lama. Gambar dari hasil peremajaan bakteri dapat dilihat pada **Lampiran 3**. Tahapan peremajaan bakteri dengan media agar miring adalah sebagai berikut.

- Dilarutkan 2 gr media TSA dengan 50 ml akuades murni kemudian diaduk di atas *hotplate* hingga mendidih dan berwarna kuning jernih,
- Dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi dengan volume masing-masing tabung 10 ml,
- Ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilisasi dengan *autoclave*,
- Dibiarkan media TSA dingin dengan memiringkan posisi tabung agar posisi media agar menjadi miring,
- Digoreskan bakteri *A. hydrophila* dengan menggunakan ose secara zigzag dan merata pada media agar miring,
- Diinkubasi bakteri yang telah ditanam pada media agar miring dalam inkubator dengan suhu 28 °C selama 24 jam.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Uji MIC dilakukan untuk mengetahui dosis minimum yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan ekstrak daun sirsak. Pengamatan MIC dilakukan dengan pengamatan kualitatif yakni dengan melihat adanya kekeruhan pada media uji yang menandakan bahwa *A. hydrophila* tumbuh namun, jika media uji bening berarti menandakan tidak

adanya pertumbuhan *A. hydrophila*. Skema kerja uji MIC dapat dilihat pada

Lampiran 4.

Penentuan konsentrasi dilakukan dengan langkah membuat stok dosis yaitu 1000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran berseri mulai dari 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0,1 ppm dengan menggunakan DMSO 10%. Pengenceran berseri dilakukan dengan melarutkan DMSO 10% sebanyak 9 ml dengan 1 ml ekstrak daun sirsak 1000 ppm untuk mendapatkan konsentrasi 100 ppm atau 10^{-1} dari konsentrasi yang diinginkan. Demikian pula untuk mendapatkan konsentrasi 10 ppm, 1 ppm dan 0,1 ppm dengan melakukan pengenceran berseri. DMSO 10% didapatkan dengan cara melarutkan 10 ml DMSO dengan 90 ml aquades murni kemudian di vortex sampai menjadi homogen. Setelah persiapan ekstrak dengan konsentrasi yang telah ditentukan kemudian dipersiapkan bakteri *A. hydrophila* pada media cair NB yang dikultur pada tabung reaksi.

Sebanyak 4,5 ml media cair NB disiapkan untuk setiap tabung reaksi yang telah diberi label 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm kemudian disterilisasi dengan *autoclave* terhitung 15 menit setelah mencapai 1 atm. Setelah media dingin dimasukkan inokulan *A. hydrophila* dengan menggunakan ose kemudian divortex hingga didapatkan kekeruhan 10^8 (Mc. Farland).

Ditunggu selama 15 menit setelah kultur bakteri pada media cair kemudian dimasukkan ekstrak daun sirsak (*A. muricata* L.) sebanyak 0,5 ml dengan 5 konsentrasi yang telah ditentukan ke dalam 5 tabung reaksi yang berisi *A. hydrophila* kemudian divortex hingga homogen. Dilihat kekeruhan masing-masing tabung reaksi kemudian ditentukan konsentrasi yang terlebih dahulu dan paling jernih yang menandakan adanya daya hambat ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L.) terhadap *A. hydrophila*.

Dari hasil Uji MIC pertama didapatkan kisaran konsentrasi ± 10 ppm sehingga dilakukan lagi Uji MIC yang kedua untuk mendapatkan konsentrasi yang lebih optimal lagi yaitu 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm, 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, 12 ppm, 13 ppm. Dari hasil Uji MIC kedua diketahui konsentrasi yang pertama kali berubah menjadi jernih yaitu 8 ppm sehingga dapat ditentukan konsentrasi yang akan digunakan untuk uji cakram yaitu 8 ppm, 12 ppm, 16 ppm, 20 ppm.

b. Uji cakram

Uji cakram dilakukan untuk mengetahui respon hambatan dari beberapa konsentrasi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L.) terhadap bakteri *A. hydrophila* apakah mampu menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau mampu membunuh bakteri (bakteriosidal) dengan pengamatan selama 2x24 jam masa inkubasi. Skema kerja uji cakram dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Langkah-langkah pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut.

- Disiapkan cawanpetri yang telah terdapat media TSA dan ekstrak kasar daun sirsak dengan konsentrasi 8, 12, 16 dan 20 ppm,
- Diambil biakan bakteri dengan mencelupkan *cotton swap*, kemudian digoreskan pada seluruh permukaan media secara zigzag hingga merata,
- Diredam kertas cakram selama 15 menit ke dalam ekstrak kasar daun sirsak dengan konsentrasi yang telah ditentukan,
- Ditiriskan kertas cakram yang sudah direndam kemudian di letakkan pada permukaan media agar dengan menggunakan pinset,
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam dengan mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong,
- Saat meletakkan kertas cakram pada permukaan media agar diupayakan bergeser karena akan dapat mengurangi validasi pengukuran.

3.4 Parameter Uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama dari penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk dikurangi diameter kertas cakram yang memiliki diameter 6 mm. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi yakni sebesar 28 °C.

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dilakukan pengujian statistik sesuai dengan metode yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL). Jika data sidik ragam memperlihatkan pengaruh berbeda nyata maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT).

