

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama, bahan ekstraksi, uji antibakteri, uji toksisitas, dan uji GCMS. Bahan utama yang digunakan adalah rumput laut cokelat *Sargassum cristaefolium*, yang diperoleh dari Desa Cabiye, Kecamatan Talango, Kabupaten, Sumenep, Madura, Jawa Timur.

Bahan yang digunakan pada proses ekstraksi yaitu pelarut n-heksan teknis, kertas saring *Whatman* nomor 1, plastik wrap, kertas label, alumunium foil, aquades. Pada proses pengujian antibakteri bahan-bahan yang digunakan meliputi ekstrak kasar teh rumput laut *Sargassum cristaefolium*, bakteri biakan murni *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan 10^6 koloni/ml, yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, TSA (*Trypton Soya Agar*), kertas cakram (*paper disc*) yang masing-masing berdiameter 6 mm, cotton swap alkohol, spirtus, aquades, tisu, dan kapas.

Pada pengujian toksisitas bahan yang digunakan adalah ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium*, air laut, hewan uji coba *Artemia salina* Leach. yang didapatkan dari Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Pembenihan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, sedangkan bahan yang digunakan untuk uji GCMS adalah ekstrak kasar teh rumput laut cokelat *Sargassum cristaefolium*.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan untuk ekstraksi, uji daya hambat, uji toksisitas dan peralatan untuk analisa senyawa bioaktif ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium*. Alat yang digunakan pada proses ekstraksi teh *Sargassum cristaefolium* adalah gelas ukur 250ml, timbangan digital, beaker glass 1000ml, *rotary vacuum evaporator* merk IKA, corong, spatula, sendok bahan, dan botol vial/botol sampel 15 ml. Alat-alat yang digunakan untuk uji daya hambat meliputi cawan petri, erlenmeyer 250ml, autoklaf untuk sterilisasi alat, timbangan analitik, inkubator, jangka sorong, *cutter*, pensil, pipa kapiler, pinset, *beaker glass* 50 ml, pipet tetes, instrumen GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometer*) merk *Simadzu* dan kamera untuk mendokumentasikan setiap proses yang dilakukan serta hasil yang didapat.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Suryasubrata (1989), metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen (Nazir, 1989).

Metode dalam uji daya hambat/uji cakram adalah metode eksperimen. Metode ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan konsentrasi berbeda pada ekstrak kasar teh rumput laut cokelat *Sargassum cristaefolium* terhadap pertumbuhan bakteri uji *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter zona bening pada setiap konsentrasi yang diberikan dimana semakin lebar zona bening, maka semakin efektif daya antibakteri yang dihasilkan.

Metode dalam uji toksisitas juga merupakan metode eksperimen, yaitu dilakukan dengan cara membuat beberapa konsentrasi dari sampel yang diujikan terhadap sejumlah larva udang *Artemia salina leach*. berumur 48 jam kemudian dihitung jumlah *Artemia salina leach*. yang mati untuk memperoleh nilai LC₅₀ (MC Laughlin,1992). Konsentrasi yang digunakan pada uji toksisitas ini adalah dimulai dari konsentrasi terendah sampai tertinggi yaitu 0 ppm (kontrol),62,5 ppm, 125 ppm,250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Setiap konsentrasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

3.2.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian uji daya hambat / uji cakram adalah n-heksan sebagai pelarut pengekstrak teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium*, sedangkan variabel terikatnya adalah perbedaan lebar diameter daerah hambatan antibakteri yang terlihat sebagai zona bening di sekitar kertas cakram dan dinyatakan dalam satuan mm. Variabel bebas dalam penelitian uji toksisitas sama seperti uji daya hambat / uji cakram yaitu n-heksan sebagai pengekstrak teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium*, sedangkan variabel terikatnya adalah jumlah *Artemia salina* Leach. yang mati dan dinyatakan sebagai nilai LC₅₀.

3.2.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam uji daya hambat / uji cakram yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 5 perlakuan yakni 3 perlakuan dengan menggunakan ekstrak kasar teh rumput laut cokelat *Sargassum cristaefolium* (10%, 20%, 30%) (b/v). Masing-masing perlakuan diuji daya hambatnya sebanyak 3 ulangan dengan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan

Streptococcus pyogenes terhadap zona hambat bakteri yang terbentuk dari setiap perlakuan. Rancangan penelitian uji daya hambat dapat pada Tabel 1.

Perlakuan

A : Kontrol positif

B : Kontrol negatif

C : ekstrak n-heksan 10%

D : ekstrak n-heksan 20%

E : ekstrak n-heksan 30%

Tabel 1. Rancangan Penelitian Uji Daya Hambat

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3
E	E1	E2	E3

Rancangan penelitian untuk uji toksisitas ekstrak kasar teh rumput laut cokelat *Sargassum cristaefolium* dengan hewan uji *Artemia salina leach*. ini dilakukan dengan menggunakan lima taraf variasi konsentrasi larutan uji ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* mulai dari konsentrasi terendah sampai yang tertinggi yaitu 0ppm (kontrol), 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Tabel rancangan penelitian uji toksisitas dapat dilihat pada tabel 2.

Perlakuan :

A : 0 ppm

B : 62,5 ppm

C : 125 ppm

D : 250 ppm

E : 500 ppm

F : 1000 ppm

Tabel 2. Rancangan Perlakuan uji Toksisitas

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3
E	E1	E2	E3

3.2.3 Parameter Uji

Parameter uji yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh. Untuk uji daya hambat bakteri dengan metode uji cakram parameternya berdasarkan luas zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi yang berbeda. Sedangkan untuk uji toksisitas parameternya berdasarkan jumlah *Artemia salina* Leach. yang mati pada tiap konsentrasi.

3.2.4 Analisis Data

Pada uji daya hambat / uji cakram untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dilakukan analisis kaergaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1%. Jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNJ pada taraf 5% untuk mengetahui perlakuan terbaik. Sedangkan pada uji toksisitas ditentukan berdasarkan analisis probit melalui tabel probit dan dibuat persamaan regresi linier

$$Y = bx + a$$

dimana : y = angka probit, dan x = log konsentrasi

Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC₅₀ dengan memasukkan nilai (50% kematian). Apabila pada kontrol ada larva yang mati, aka kematian ditentukan dengan rumus (Mayer *et al.*, 1982).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Ekstrak Teh *Sargassum cristaefolium*

Serbuk teh *Sargassum cristaefolium* dimaserasi dengan menggunakan pelarut n-heksan teknis dengan perbandingan 1:5 selama 2 x 24 jam dengan temperatur suhu 40°C didalam ruangan sambil sesekali dilakukan pengocokan (penghomogenan). Ekstraksi ini menggunakan metode maserasi yaitu metode dengan merendam sampel dalam pelarut, dengan tujuan agar komponen boaktif yang bersifat non-polar pada sampel terlarut dalam pelarut n-heksan. Kemudian hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat. Filtrat hasil maserasi disentrifius untuk memisahkan filtrat dengan endapan. Setelah dilakukan proses sentrifius, filtrat yang didapat kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium*.

Proses pemisahan pelarut dilakukan dengan *rotary evaporator* agar pelarut dapat dipisahkan pada tekanan tinggi dan suhu yang lebih rendah daripada suhu titik didih pelarut yang digunakan sehingga senyawa dalam ekstrak tidak rusak. Untuk ekstrak hasil evaporasi ditampung dalam botol vial.

3.3.2 Uji Cakram

Menurut Wiyanto (2010), uji cakram yang distandarisasikan (Kirby-Bauer, 1966) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Langkah awal yang dilakukan pada uji cakram yaitu menyiapkan media pertumbuhan bakteri uji. Media yang digunakan yaitu TSA untuk menumbuhkan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Biakan murni bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan 10⁸ koloni/ml. koleksi milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya Malang. Peremajaan bakteri *Aeromonas salmonocida* dan *Streptococcus pyogenes* dilakukan dengan cara menanam pada media TSA miring. Kemudian hasil penanamannya dipanen dan diambil menggunakan kawat ose lalu dimasukkan kedalam NaFis 10%. Kemudian campuran bakteri dihomogenkan dalam NaFis dan ditanam kemedial TSA menggunakan pipet serologis sebanyak 0,1 ml. Setelah itu bakteri ditanam dengan metode tebar.

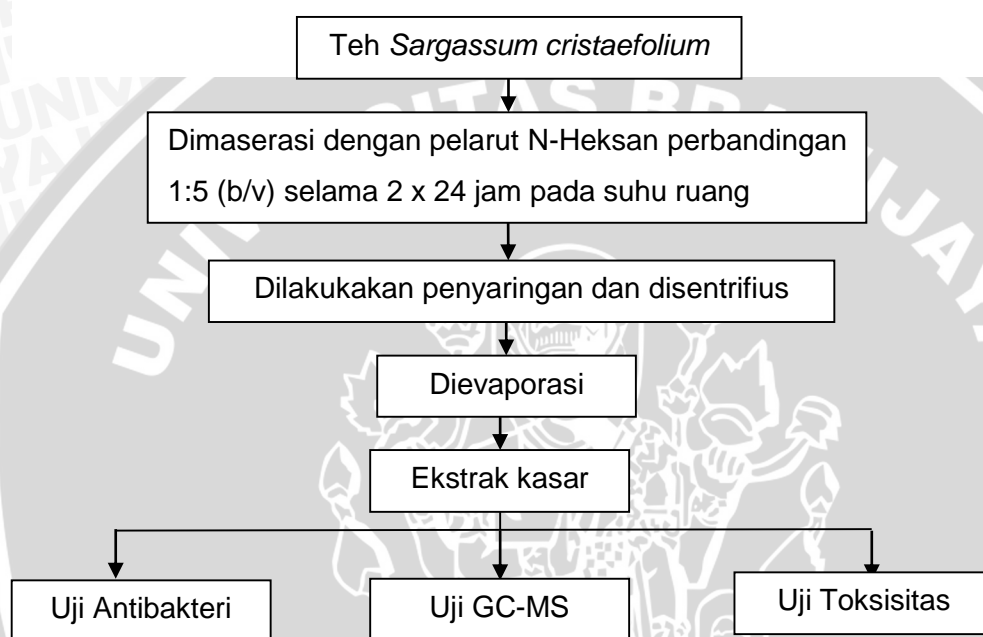
Kertas cakram direndam dalam ekstrak teh *Sargassum cristaefolium* dengan berbagai konsentrasi (10%, 20%, 30%) selama 15-30 menit. Kemudian kertas cakram tersebut ditempelkan TSA yang berisi bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati dan diukur zona hambatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Alur pembuatan media TSA dapat dilihat pada lampiran 1, sedangkan untuk Alur kerja uji cakram menurut kirby bauer (1966) dapat dilihat pada lampiran 2. Penghambatan pertumbuhan bakteri penguji oleh ekstrak sampel yang memiliki kandungan antibakteri terlihat zona bening yang tidak ditumbuhi bakteri uji.

3.3.3 Uji Toksisitas

Sebelum melakukan uji toksisitas terlebih dahulu menyiapkan hewan uji *Artemia salina leach*. Penyiapan larva dilakukan dengan mengambil telur *Artemia salina leach*. sebanyak 5 gram. Telur *Artemia salina leach*. direndam didalam air laut. Suhu penetasan adalah $\pm 25-30^{\circ}\text{C}$ dan pH $\pm 6-7$. Telur akan menetas setelah 18-24 jam dan larvanya disebut naupli. Naupli siap untuk uji BSLT setelah larva ini berumur 48 jam (Awik *et al.*, 2006). Skema uji toksisitas terhadap *Artemia salina leach*. disajikan pada lampiran 3.

Uji toksisitas pada *Artemia salina leach*, larutan uji dengan konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dilakukan 3 kali pengulangan

untuk setiap konsentrasi yang telah ditentukan pada masing-masing sampel dan dibandingkan dengan kontrol (0 ppm). Bejana uji yang digunakan adalah botol vial. 10 ekor *Artemia salina leach*. dimasukkan kedalam setiap botol vial yang diberikan ekstrak larutan uji dengan konsentrasi yang berbeda. Skema uji tosisitas ekstrak kasar teh rumput laut cokelat (*Sargassum cristaefolium*). Skema kerja penelitian dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Skema Kerja Penelitian.

3.3.4 Analisa GC-MS

Analisa GC-MS dilakukan terhadap ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* yang diekstrak dengan menggunakan pelarut n-heksan. Gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan laju aliran diatur sebagai berikut. Suhu injektor 290° C, suhu awal oven 100° C, laju kenaikan suhu 10° C/menit, dan suhu akhir oven 290° C. Identifikasi senyawa dilakukan dengan bantuan perangkat lunak PC.