

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi penelitian terdiri dari bahan penelitian dan alat penelitian. Bahan dan alat pada penelitian antara lain:

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk membuat ekstrak kasar, alat untuk uji kadar air, NanoDrop, kjeldahl dan alat untuk uji HPLC. Alat untuk persiapan serbuk cacing adalah pisau, oven dan blender. Alat-alat untuk pembuatan ekstrak kasar adalah beaker glass 500 mL, timbangan digital, spatula, *shaker*, corong, *rotary evaporator* merk IKA (no seri 232, IKA works ASIA, Malaysia, 2003), gelas ukur 100 mL dan botol vial 10 mL. Alat untuk uji NanoDrop adalah mikropipet, corong mikropipet, alat NanoDrop (tipe ND 1000, nomor seri 9189, Thermo Fisher Scientific, USA, 2006), *micropipet*, botol vial, pipet tetes, dan komputer. Untuk pengujian kadar air alat yang digunakan antara lain botol timbang, desikator, oven, dan *crushable tank*. Alat-alat untuk uji total N dengan metode kjeldahl adalah timbangan analitik, labu destruksi, alat destruksi, desikator, labu kjeldahl, oven, dan destilator merk Kjelmater buchi K-375 (Grobest Corporation Co. Ltd., Thailand, 2006). Sedangkan alat untuk pengujian asam amino dengan HPLC antara lain alat HPLC (RF 20 A tipe ICI dengan kolom ODS, merk Shimadzu, Kyoto, Japan, 2007), kertas saring (whatman milipore 0,45, GE healthcare, Buckinghamshire, Inggris), syringe 100 mikrolit, botol vial 1 ml, mikropipet, timbangan analitik, corong dan labu takar 100 ml.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama, bahan untuk preparasi serbuk cacing, bahan untuk membuat ekstrak kasar, bahan untuk pengujian kadar air, uji NanoDrop, kjeldahl dan bahan untuk uji HPLC. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cacing tanah hidup spesies *Lumbricus rubellus* dan *Eisenia foetida* yang diperoleh dari pembudidaya cacing tanah di CV. Rumah Alam Jaya Organik yang berada di Kelurahan Sukun Kota Malang serta cacing laut *Nereis sp.* yang diperoleh dari pesisir laut Tuban dan Situbondo Jawa Timur. Bahan untuk preparasi serbuk cacing adalah cacing hidup, plastik zip dan air bersih. Bahan untuk membuat ekstrak kasar adalah etanol 96%, alumunium foil, kertas label, kertas saring, *plastic wrap*, aquadest dan air. Bahan untuk uji NanoDrop adalah aquadest steril, blanko (etanol 96%), ekstrak kasar cacing dan tisu. Bahan untuk uji Kjeldal, uji kadar air dan HPLC adalah ekstrak kasar etanol cacing tanah *Lumbricus rubellus*, *Eisenia foetida* dan cacing laut *Nereis sp.* Bahan yang digunakan untuk uji N total yaitu H_2SO_4 dan NanoDrop yaitu ekstrak kasar dan etanol. Bahan yang digunakan untuk daya hambat yaitu media MHA, bakteri *Salmonella typhi*, DMSO dan kertas cakram.

3.2 Metode Penelitian

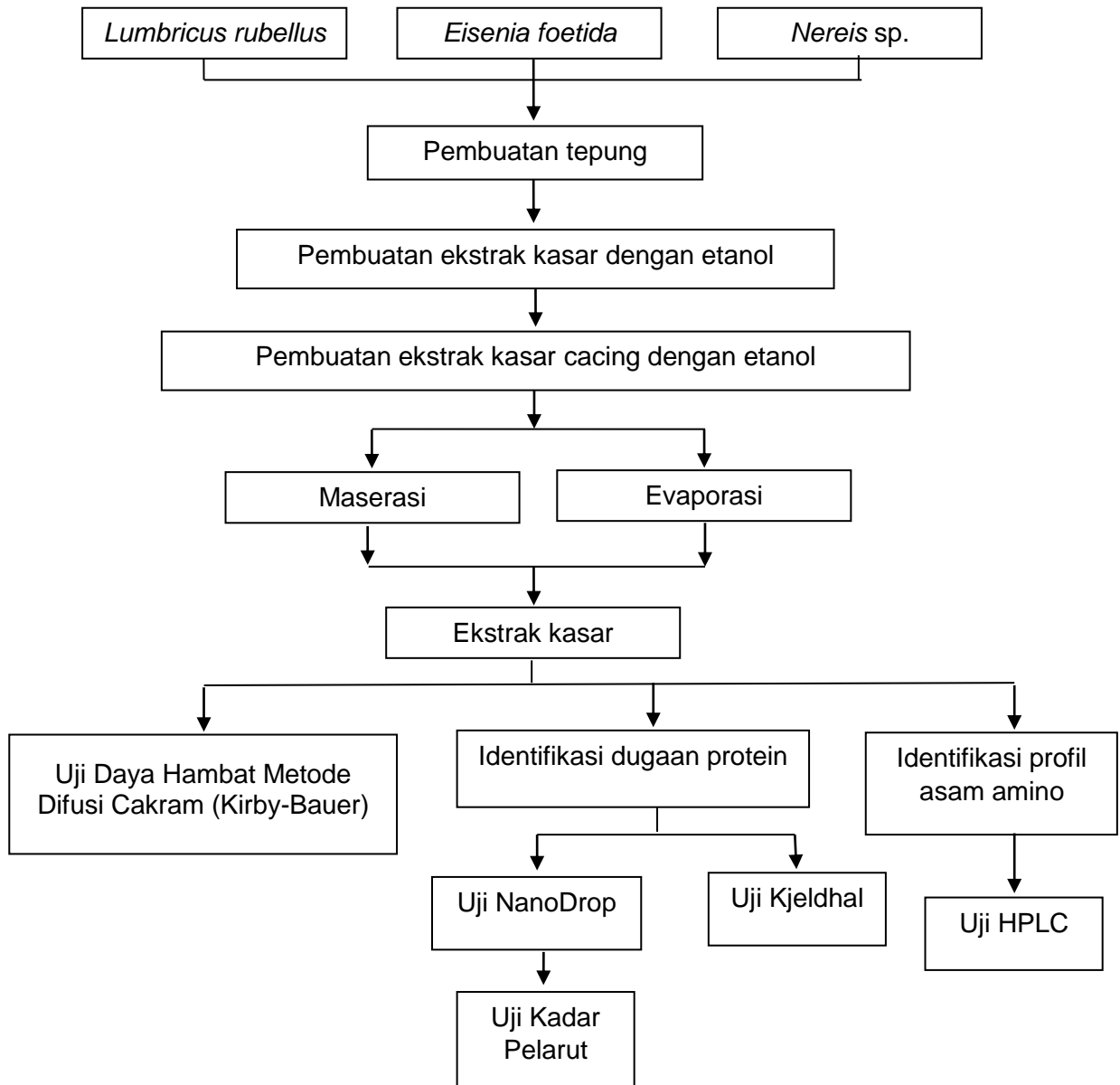
Metode yang digunakan dalam penelitian ini merupakan metode deskriptif. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena, dalam penelitian ini tidak dimaksudkan untuk menguji hipotesis tertentu tetapi hanya menggambarkan apa adanya suatu variabel, gejala atau keadaan (Arikunto, 2002).

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 (Surakhmad, 1994). Metode deskriptif pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan *Eisenia foetida* serta cacing laut *Nereis sp.*

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian secara garis besar terbagi menjadi tiga tahapan yaitu persiapan bahan, pelaksanaan pengujian dan analisis. Bahan baku berupa cacing laut *Nereis sp.*, cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan cacing tanah *Eisenia foetida* diekstraksi dengan pelarut etanol melalui proses maserasi dan dilanjutkan pembentukan ekstrak kental melalui proses penguapan menggunakan *rotary evaporator*. Metode uji yang digunakan untuk sebagai uji penduga protein yaitu NanoDrop dan kjeldahl kemudian dilanjutkan dengan uji profil asam amino menggunakan HPLC. Pengujian ini akan menghasilkan data – data penelitian yang kemudian dapat dianalisis dan menentukan hasil penelitian. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Skema Alur Penelitian

3.4 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan meliputi pembuatan tepung cacing *Lumbricus rubellus*, *Eisenia foetida* dan cacing laut *Nereis sp.*, pembuatan ekstrak kasar cacing tanah *Lumbricus rubellus*, *Eisenia foetida* dan cacing laut *Nereis sp.* dengan pelarut etanol. Pembuatan ekstrak dengan cara maserasi dan pemisahan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Penelitian pendahuluan

bertujuan untuk mengetahui rendemen tepung sampel dan ekstrak terhadap berat basah sampel.

3.4.1 Pembuatan Tepung Cacing

Pembuatan tepung cacing mengacu pada metode Sudarmi *et al.*, (2012), dengan modifikasi. Cacing tanah hidup yang diperoleh dari CV. Rumah Alam Jaya Organik di Kelurahan Sukun Kota Malang mula-mula dipisahkan dari media yang berupa campuran tanah dan ampas tebu kemudian cacing dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran. Cacing kemudian dibelah tubuhnya untuk membuang kotoran di dalam saluran pencernaan kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Selanjutnya cacing dikeringkan dengan oven suhu 60°C. Cacing yang sudah kering dihaluskan dengan *chopper* untuk mendapatkan tepung cacing. Tepung cacing kemudian dikemas dengan wadah tertutup dan kedap udara untuk mempertahankan kualitas tepung.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kasar Cacing

Pembuatan ekstrak kasar cacing mengacu pada metode ekstraksi Sudarmi *et al.*, (2012), dengan modifikasi. Serbuk cacing sebanyak 50 g dimasukkan ke *beaker glass* 500 mL kemudian ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:7,5 sebanyak 375 mL, *beaker glass* ditutup dengan plastik wrap dan alufo. Kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang dan dihomogenkan dengan *shaker*. Filtrat disaring dengan kertas saring dan residu kembali dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 125 mL selama 12 jam. Filtrat hasil maserasi pertama dan kedua dicampur dan disaring kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang dan selanjutnya dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental dengan *rotary evaporator* suhu 55°C selama ±45 menit. Pembuatan ekstrak kasar etanol cacing laut dan cacing tanah dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.5. Penelitian Utama

Penelitian utama meliputi uji konsentrasi protein menggunakan NanoDrop, perhitungan N total menggunakan metode kjeldahl, perhitungan asam amino total menggunakan HPLC dan uji daya hambat dengan metode difusi cakram.

3.5.1 Uji NanoDrop

Proses pengujian konsentrasi protein menggunakan NanoDrop (tipe ND 1000, nomor seri 9189, Thermo Fisher Scientific, USA, tahun 2006). Uji dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang.

Pengukuran sampel protein A280 menggunakan NanoDrop *Spectrophotometer* ND-1000 dengan cara membuka pedestal atas alat, dibersihkan pedestal atas dan bawah alat menggunakan tisu bersih yang telah dibasahi dengan aquades steril. Letakkan 1,5 μ L aquades steril di pedestal bawah dan pedestal atas ditutup. Buka software dan pilih prog protein A280 lalu klik OK. Setelah alat terinisialisasi pilih tipe sampel dengan menekan tombol blanko dan biarkan alat bekerja. Setelah blanko terukur yakinkan bahwa tombol record telah aktif. Kemudian buka pedestal atas dan usap aquades pada pedestal atas dan bawah menggunakan tisu (kering lembut dan bersih). Kemudian prosedur diulang untuk menguji sampel. Skema kerja pengujian NanoDrop ditunjukkan pada Lampiran 3.

3.5.2 Uji Kjeldahl

Metode kjeldahl merupakan metode yang digunakan untuk penetapan jumlah nitrogen pada asam amino, protein, dan senyawa yang mengandung nitrogen. Alat utama yang digunakan adalah kjelmaster buchi k-375 (Grobst Corporation Co. Ltd., Thailand, 2006). Metode kjeldahl dapat dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu proses destruksi, destilasi, dan titrasi.

Uji N total menggunakan metode kjeldahl dilakukan di Laboratorium Keamanan Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya. Tahap destruksi menggunakan cara manual yaitu dengan cara menambahkan 25mL H_2SO_4 dan katalisator kedalam labu kjeldahl yang berisi 0,5 g sampel kemudian dipanaskan hingga berwarna bening kehijauan. Adapun proses destilasi dan titrasi dilakukan dengan alat otomatis yaitu Kjelmater Buchi k-375. Alur proses uji N total menggunakan metode kjeldahl dapat dilihat pada lampiran 4. Hasil uji kjeldahl ini kemudian dikonfersikan ke protein berat kering (*dry base protein*) berdasarkan hasil perhitungan kadar pelarut.

Pada tahap destruksi sampel dipanaskan dalam asam sulfat pekat sehingga terjadi destruksi menjadi unsur-unsurnya, elemen karbon, hydrogen teroksidasi menjadi CO, CO_2 , dan H_2O . sedangkan nitrogennya akan berubah menjadi $(NH_4)_2SO_4$. Untuk mempercepat proses destruksi sering ditambahkan katalisator berupa campuran Na_2SO_4 dan HgO. Adapula selenium yang dapat mempercepat proses oksidasi karena selain dapat menaikkan titik didih juga mudah mengadakan perubahan dari valensi rendah atau sebaliknya. Pada tahap destilasi, ammonium sulfat dipecah menjadi ammonia (NH_3) dengan penambahan NaOH sampai alkalis dan dipanaskan. Agar terjadi *super heating* (pemercikan cairan) atau timbulnya gelembung gas yang besar maka ditambahkan logam zink (Zn). Ammonium yang dibebaskan selanjutnya akan ditangkap oleh asam klorida atau asam borat 4% dalam jumlah yang berlebihan (Bakhtra *et al.*, 2016).

Dari tahapan terakhir titrasi dapat diketahui banyaknya asam klorida yang bereaksi dengan ammonia. Destilat dititrasi dengan natrium hidroksida hingga titik ekuivalen yang ditandai dengan berubahnya warna merah muda menjadi warna kuning karena adanya natrium hidroksida berlebih yang menyebabkan

suasana asam. Melalui titrasi ini dapat diketahui kandungan N dalam bentuk NH_4 (Bakhtra *et al.*, 2016).

3.5.3 Kadar Air

Kadar air atau kadar pelarut ditentukan berdasarkan metode *termogravimetri*. Prinsip metode *termogravimetri* yang dikemukakan oleh Sudarmadji *et al.*, (2007) yakni mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105–110 °C selama 3 jam atau didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Prosedurnya yaitu sampel ditimbang 2 g dimasukkan dalam botol timbang yang juga telah diukur beratnya lalu dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Ditimbang berat akhir sampel lalu dihitung persen kadar air. Prosedur pengujian kadar air dapat dilihat pada Lampiran 6. Rumus perhitungan kadar air :

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{(A+B)-(C)}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat botol timbang (g)

B = Berat sampel (g)

C = Berat akhir (Botol timbang + sampel) (g)

3.5.4 Analisis Asam Amino dengan HPLC

Untuk mendapatkan analisa asam amino ditentukan dengan menggunakan HPLC (RF 20 A tipe ICI dengan kolom ODS, merk Shimadzu, Kyoto, Japan, 2007), sesuai prosedur dari Laboratorium Kimia Terpadu, IPB. 50 μL larutan sampel dicampur dengan jumlah yang sama buffer kalium borat. 5 μL campuran tersebut diambil dan disimpan pada suatu vial auto sampler antara posisi 1-44. Vial lain dengan larutan kerja reagen OPA ditempatkan pada posisi 45 dari korsel autosampler. Selanjutnya sampel sebanyak 5 μL diinjeksikan ke dalam kolom HPLC. Agar proses pemisahan asam amino memberikan hasil yang baik, maka setiap proses kromatografi kolom selalu

disetimbangkan dengan buffer A. Hal ini dapat diprogramkan ke dalam file gradien dari program gradien K-45.

3.5.5 Uji Daya Hambat Metode Difusi Cakram

Pengujian daya hambat menggunakan metode kirby-bauer sesuai penelitian Bustanussalam *et al.*, (2012), dengan modifikasi. Uji daya hambat ini untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar cacing tanah dan cacing laut yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Media MHA sebanyak 6,84 g ditimbang dan dilarutkan ke dalam 180 ml aquades. Media disterilisasi pada suhu 121° C selama 15 menit di dalam autoklaf.

Bakteri uji yang digunakan adalah *Salmonella typhi* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Peremajaan isolate murni dengan cara mengambil 4-10 ose, dibiakkan pada media agar miring dan diinkubasi selama 24 jam. Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mengambil 4-10 ose dari biakan bakteri dan dicelupkan ke dalam Nafis dengan kepadatan setara larutan Brown 1 atau 304×10^{-8} CFU/ml. Berdasarkan pengukuran kepadatan dengan spektrofotometer UV vis pada λ 650 nm diperoleh kepadatan sebesar 369×10^6 CFU/mL. Penanaman bakteri mengacu pada penelitian Halim *et al.*, (2013), menggunakan *cotton swab* steril. *Cotton swab* dicelupkan dalam suspensi kemudian diperas secara melingkar pada bagian dalam tabung reaksi dan digoreskan secara berkesambungan pada media MHA padat.

MHA (*Muller Hilton Agar*) merupakan media yang memungkinkan semua bakteri dapat tumbuh karena media ini bukan merupakan media selektif dan media diferensial. Mengandung starch (tepung pati) yang berfungsi untuk menyerap racun yang dikeluarkan bakteri, sehingga tidak mengganggu antibiotik.

Rendah sulfonamide, trimethoprim, dan tetracycline inhibitors. Mendukung pertumbuhan bakteri non-fastidious yang pathogen (Acumedia, 2011).

Kertas cakram steril merk oxoid direndam dalam larutan ekstrak kasar yang dibuat dalam 6 konsentrasi yaitu 0, 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000 ppm dengan DMSO 10% sebagai pelarut. Kontrol positif berupa antibiotik kloramfenikol. Penggunaan kloramfenikol bertujuan untuk mengetahui karakteristik bakteri uji terhadap antibiotik komersial tersebut. Inkubasi cawan dilakukan selama 8 jam pada suhu 37⁰C. Setelah 8 jam, cawan dikeluarkan dari inkubator dan diamati ada atau tidaknya zona bening. Pengamatan dilakukan dengan menghitung diameter zona bening yang terbentuk (mm) menggunakan jangka sorong dan diulang tiga kali pengulangan agar didapatkan hasil yang mendekati sempurna. Pengukuran zona bening dilakukan dengan cara hasil pengukuran dari zona bening dikurangi dengan diameter cakram.

DMSO (dimetil sufoksida) 10% merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar. Selain itu DMSO tidak memberikan daya hambat pertumbuhan bakteri sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan pengujian aktivitas antibakteri dengan metoda difusi agar (Handayani *et al.*, 2009).