

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Juni 2014 di Laboratorium organik Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

3.2 Alat dan Bahan penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, neraca analitik, seperangkat alat gelas, pengaduk, gelas arloji, cawan petri, tabung reaksi, *shaker water bath*, rak, tisu, plastik wrap, jarum ose, inkubator, pinset, autoklaf, bunsen burner, pipet mikro, spektrofotometer, Erlenmeyer, vortex, *laminar air flow*, *rotari evaporator vacum*, kertas whatman no 1, alumunium foil, kapas, dan pinset.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pare, etanol 96%, aquades, reagen mayer, reagen dragendrof, FeCl_3 1%, HCl pekat, HCl 2%, serbuk Mg, larutan gelatin, dan isolat bakteri *Edwarsiella tarda* yang diperoleh dari Balai Karantina Ikan Juanda Sidoarjo. Media tumbuh bakteri yang digunakan adalah TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan TSB (*Tryptic Soy Broth*).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan dua faktor yaitu faktor pertama adalah perlakuan ekstrak etanol dan ekstrak air buah pare dan faktor kedua adalah pengaruh konsentrasi ekstrak buah pare. Rancangan percobaan terdiri dari:

Faktor 1 : Jenis pelarut ekstrak

P1 = Ekstrak etanol buah pare

P2 = Ekstrak air buah pare

Faktor 2 : Konsentrasi

K1 = Konsentrasi 6 mg/ml (b/v)

K2 = Konsentrasi 8 mg/ml (b/v)

K3 = Konsentrasi 10 mg/ml (b/v)

K4 = Konsentrasi 12 mg/ml (b/v)

Rancangan penelitian

K \ P	P1	P2
K1	K1P1	K1P2
K2	K2P1	K2P2
K3	K3P1	K3P2
K4	K4P1	K4P2

Dari kombinasi tersebut, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga terdapat 24 kombinasi perlakuan. Kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri

terhadap bakteri *Edwardsiella tarda*. Aktivitas terbaik dapat dilihat dari zona hambat yang terbesar. Kemudian dilanjutkan dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menggunakan metode difusi tabung.

3.4 Variabel

Variabel-variabel dalam penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah berbagai konsentrasi ekstrak buah pare (*Momordica charantia*).

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) buah pare (*Momordica charantia*).

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang diusahakan sama untuk setiap perlakuan seperti, suhu, waktu inkubasi, dan media.

3.5 Tahapan penelitian

1. Ekstrak etanol dan ekstrak air buah pare

- a. Uji senyawa aktif secara kualitatif

2. Pembuatan inokulum bakteri *Edwardsiella tarda*

- a. Sterilisasi alat

- b. Pembuatan media

- c. Regenerasi bakteri *Edwardsiella tarda*

- d. Inokulum bakteri *Edwardsiella tarda*

3. Kurva standart bakteri *Edwardsiella tarda*
 - a. Suspensi bakteri *Edwardsiella tarda*
4. Uji aktivitas antibakteri
 - a. Uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode cakram kertas
5. Uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM)
6. Analisa Data

3.6 Cara kerja

3.6.1 Ekstraksi Buah Pare

Metode ekstraksi yang akan dipakai dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Sebelumnya, 8 kg pare dibersihkan dengan dicuci kemudian diiris tipis-tipis dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 3 hari. Buah pare yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan *blender* hingga menjadi serbuk sebanyak 300 gram. Dipisahkan 150 gr untuk masing-masing pelarut etanol 96% dan pelarut air. Kemudian serbuk pare sebanyak 150 gr dimasukkan kedalam *Erlenmeyer* dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml dan serbuk pare sebanyak 150 gr dimasukkan kedalam *Erlenmeyer* dan ditambahkan pelarut aquades sebanyak 1500 ml dan masing-masing di shaker selama 30 menit. Selanjutnya larutan dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah 24 jam, larutan difiltrasi atau dipisahkan dengan menggunakan penyaring *Buchner*. Maserat yang terbentuk kemudian diuapkan melalui penguap putar (*Rotary evaporator*) suhu 60°C pada pelarut etanol dan suhu

90°C pada pelarut aquades, sehingga didapatkan ekstrak kental (Modifikasi Dewi, 2010).

3.6.2 Uji Senyawa Aktif Secara Kualitatif Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air Buah Pare

3.6.2.1 Uji Flavonoid

Ekstrak buah pare masing-masing sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan metanol 50%, 0,5 ml HCl dan logam Mg. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Warna merah sampai jingga diberikan oleh senyawa flavon, warna merah tua diberikan oleh flavonol atau flavonon, warna hijau sampai biru diberikan oleh aglikon atau glikosida (Marliana, 2005)

3.6.2.2 Uji Alkaloid

Ekstrak buah pare masing-masing sebanyak 1 mg ditambahkan 0,5 ml HCl 2%. Larutan dibagi dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendrof, tabung 2 ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada tabung 1 dan endapan putih pada tabung 2 menunjukkan adanya alkaloid (Khunaifi, 2010)

3.6.2.3 Uji Saponin

Ekstrak buah pare masing-masing sebanyak 1 mg ditambahkan aquades 10 ml dan dikocok kuat-kuat selama 30 menit sampai muncul busa. Letakkan tabung reaksi dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila masih terdapat busa, maka kemungkinan mengandung saponin. Untuk memastikan bahwa busa yang

terbentuk berasal dari saponin dan bukan berasal dari tumbuhan maka teteskan larutan asam sebanyak 3 tetes. Bila busa stabil maka dipastikan terdapat saponin (Sari, 2010)

3.6.2.4 Uji Polifenol

Ekstrak buah pare masing-masing sebanyak 1 mg dipanaskan dengan air 10 ml selama 30 menit di atas tangas air mendidih, disaring setelah dingin ditambah pereaksi FeCl_3 1% sebanyak 3 tetes. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya polifenol (Sari, 2010)

3.6.2.5 Uji Tanin

3.6.2.5.1 Uji dengan FeCl_3

Ekstrak buah pare masing-masing sebanyak 1 mg dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2 – 3 tetes larutan FeCl_3 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka bahan tersebut mengandung tanin (Sari, 2010)

3.6.2.5.2 Uji dengan Larutan Gelatin

Ekstrak buah pare masing-masing sebanyak 1 mg dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya tanin (Sari, 2010)

3.6.3 Pembuatan Media

3.6.3.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan disterilkan ditutup dengan alumunium foil atau kapas. Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf dan diatur pada suhu 121 °C

dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*). Sterilisasi dilakukan untuk alat selama 15 menit.

3.6.3.2 Media TSA

Ditimbang 24 gr medium TSA lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml, dilarutkan dengan ditambahkan 600 ml akuades. Kemudian di homogenkan menggunakan *magnetic stirrer* di atas alat pemanas dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.3.3 Media TSB

Ditimbang 18 gr medium TSB lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer 500 ml, dilarutkan dengan ditambahkan aquadest sebanyak 600 ml, kemudian di homogenkan menggunakan magnetic stirrer diatas alat pemanas. Kemudian ditambahkan dengan aquadest sampai 500 ml lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

3.6.4 Regenerasi bakteri

Dilakukan regenerasi biakan murni bakteri *Edwardsiella tarda* dengan digores 1 ose dan ditumbuhkan dalam tabung reaksi berisi 5 ml media miring TSA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

3.6.5 Pembuatan Inokulum

Dilakukan inokulum kultur bakteri dari hasil regenerasi ke dalam media TSB 100 ml dengan diambil 1 ose bakteri *Edwardsiella tarda* kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam dengan kecepatan *shaker* 130 rpm (Wang, 2012)

3.6.6 Kurva standart

Hasil inokulum bakteri *Edwardsiella tarda* yang telah diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 120rpm pada suhu 35°C dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} . Tabung pertama diisi dengan inokulum sebanyak 12 ml dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10^{-1}). Pengenceran kedua diisi dengan media TSB 6 ml dan ditambahkan 6 ml inokulum dari pengenceran pertama dan dihitung sebagai pengenceran kedua (10^{-2}). Masing-masing tabung diisi 6 ml media TSB dan ditambahkan dengan 6 ml dari pengenceran sebelumnya, begitu seterusnya hingga pengenceran kelima (10^{-5}). Kemudian diambil masing-masing pengenceran 4 ml dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Diambil 1 ml pengenceran dituang ke dalam 9 ml aquades steril dan dilakukan pengenceran sampai 10^{-10} . Kemudian dari pengenceran 10^{-5} sampai 10^{-10} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam cawan petri. Kemudian ditambahkan ± 10 ml media TSA, lalu cawan petri digoyang-goyang supaya TSA merata, dibiarkan beberapa menit sampai membeku. Lalu cawan petri di inkubasi dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24 jam (Modifikasi Handayani, 2006).

3.6.6.1 Pembuatan Suspensi Bakteri *Edwardsiella tarda*

Pembuatan stok inokulum bakteri *Edwardsiella tarda* yang diinkubasi selama 24 jam. Kemudian inokulum diukur OD dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm untuk menghasilkan OD standart. Dilakukan

pengenceran sampai dengan 10^6 sesuai dengan OD hasil kurva standart. Suspensi bakteri siap untuk digunakan.

3.6.7 Uji Aktivitas Antibakteri

3.6.7.1 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air Buah Pare

(*Momordica charantia* L)

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram (diameter 6 mm). Dimasukkan suspensi bakteri sebanyak 0,25 mL ke dalam cawan petri steril, kemudian dimasukkan media TSA yang masih cair sebanyak ± 15 ml, dan media dibiarkan memadat. Di atas medium TSA diletakkan kertas cakram steril yang telah direndam dengan masing-masing ekstrak etanol dan ekstrak air buah pare dengan konsentrasi 100% selama 30 menit. Dilakukan kontrol dengan merendam kertas cakram pada *kloramfenikol*. Kertas cakram tersebut diletakkan di atas permukaan media bakteri menggunakan pinset dan ditekan sedikit. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam (Suganda, 2003). Setelah 24 jam diamati ada tidaknya zona bening disekitar kertas cakram. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Adanya daerah bening di sekeliling cakram kertas menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

Luas zona hambat = Luas zona bening – Luas kertas cakram (Dewi, 2010)

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan metode difusi tabung/pengenceran, media yang digunakan adalah *triptone soya broth* (TSB) pada tabung reaksi dan media *triptone soya agar* (TSA) pada cawan petri

3.6.8 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air Buah Pare (*Momordica charantia* L)

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah yang mampu menghambat bakteri yang ditandai dengan kejernihan dalam media tabung. Penentuan KHM digunakan 12 tabung reaksi yang masing-masing berisi 9,5 ml media TSB. Setiap tabung reaksi ditambah 0,25 ml suspensi bakteri dan 0,25 ml ekstrak etanol buah pare dengan konsentrasi sesuai perlakuan. Diambil 2 ml secara aseptis untuk dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 600 nm sebagai pembanding sebelum perlakuan atau kontrol. Kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 35°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, larutan divortex terlebih dahulu sebelum diukur nilai absorbansinya kembali (Modifikasi Arinta, 2012). Dilanjutkan dengan uji antibakteri ekstrak air buah pare, pengujian dilakukan sama dengan percobaan ekstrak etanol buah pare. KHM ditentukan dengan menghitung OD setelah perlakuan inkubasi dikurangi OD sebelum perlakuan. Apabila terdapat konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri, ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan (OD bakteri adalah ≤ 0), maka didapatkan konsentrasi hambat minimum (Dewi, 2010). Dilanjutkan penanaman dengan metode *pour plate* pada setiap tabung perlakuan yang mengalami kejernihan untuk mengidentifikasi adanya pertumbuhan bakteri dengan di inkubasi selama 24 jam.

Setelah biakan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°C kemudian dilakukan pengamatan biakan bakteri dengan menggunakan *colony counter*. Biakan yang dihitung diambil koloni yang tumbuh sesuai dengan standart plat count yaitu 30-300 koloni percawan. Adapun cara menghitung koloni dalah sebagai berikut:

1. Satu koloni dihitung 1 koloni
2. Dua koloni yang bertumpuk dihitung satu koloni
3. Beberapa koloni yang berhubungan dihitung 1 koloni
4. Dua koloni yang berhimpitan dan masih dapat dibedakan dihiung 2 koloni
5. Satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan, dihitung sebagai 1 koloni
6. Satu koloni yang membentuk satu deretan atau rantai dan terlihat sebagai satu garis tebal dihitung sebagai 1 koloni
7. Dari hasil perhitungan yang dilakukan, kemudian dihitung jumlah koloni per ml dengan cara:

$$\begin{aligned}\text{Jumlah mikroba hidup} &= \text{jumlah koloni} \times \text{faktor pengenceran (Fp)}, (\text{CFU} / \text{mL}) \\ &= a,b \times Fp\end{aligned}$$

3.6.9 Analisa Data

Analisa yang digunakan adalah uji *two way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi dan jenis pelarut ekstrak buah pare terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Edwarsiella*

tarda. Kemudian dilanjutkan uji UJD (Uji Jarak Duncan) dengan taraf signifikan 5 % (0,05) untuk mengetahui perlakuan yang terbaik dari masing-masing konsentrasi.

