

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Juni 2012 bertempat di Laboratorium Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung dan Laboratorium Budidaya Perikanan Jurusan Budidaya Perairan Universitas Lampung, Bandar Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah kamera, blender, erlenmeyer 500 ml dan 250 ml (Pyrex®), autoklaf, oven, *hot plate* (Stuart CB162™), *vortex* (V-1 plus HDECO-Germany™), *vacum evaporator* (Heidolph), *magnetic stirrer*, inkubator, cawan petri 150 x 15 mm (Normax®), jarum ose, tabung reaksi 5 ml (Iwaki glass™), *laminary flow*, gelas ukur, bunsen, tisu, kertas kopi, kertas saring, sentrifuse, spreader, mikropipet (Nesco®), mikro tube, gelas objek, *blank disc*, jangka sorong 0,05 mm, dan alumunium foil.

Bahan yang digunakan adalah kulit buah dan biji rambutan yang diekstrak dalam pelarut etanol 70 %, artemia berusia 48 jam, isolat bakteri *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Streptococcus* sp., dan *V. alginolyticus*, media bakteri *Trypticase Soy Agar* (TSA (CM0131, OXIOD™)), TSA 2,5% NaCl, *Trypticase Soy Broth* (TSB (CM0129, OXIOD™)), MHB (*Muller Hilton Broth*), spiritus, akuades, air laut, OTC (*oxytetracycline*), dan alkohol.

## **C. Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini bersifat eksploratif dengan memanfaatkan kulit buah dan biji rambutan sebagai senyawa antibakteri. Penelitian ini merupakan penelitian awal dan belum diketahui senyawa-senyawa yang terdapat pada kulit buah dan biji rambutan dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antibakteri atau tidak.

Penelitian ini terdiri dari 3 tahap, yaitu:

1. Tahap persiapan, meliputi sterilisasi alat, pembuatan ekstrak kulit buah dan biji rambutan dengan pelarut etanol dan pembuatan media isolat bakteri.
2. Tahap pelaksanaan, meliputi uji bakteriostatik ekstrak kulit buah dan biji rambutan dan uji toksisitas menggunakan artemia.
3. Tahap pengamatan, meliputi penentuan ekstrak yang efektif menghambat bakteri, pengukuran diameter zona hambat, konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp., dan *V. alginolyticus* dan tingkat mortalitas ekstrak kulit buah dan biji rambutan pada artemia.
4. Analisis Data

### **1. Tahap Persiapan**

#### **1.1. Sterilisasi Alat**

Sterilisasi bertujuan untuk membebaskan alat dari mikroorganisme kontaminan. Sterilisasi dapat dilakukan dengan sterilisasi basah dan kering. Sterilisasi basah menggunakan autoklaf, sedangkan sterilisasi kering menggunakan oven. Alat-alat yang akan disterilisasi sebelumnya dibungkus dengan kertas kopi, yang bertujuan untuk mencegah air masuk pada saat

dilakukan sterilisasi. Sterilisasi basah dilakukan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Sedangkan pada sterilisasi kering pada suhu 120°C.

## **1.2. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah dan Biji Rambutan**

Pembuatan ekstrak kulit buah dan biji rambutan dilakukan dengan metode maserasi. Rambutan diperoleh dari pedagang buah rambutan di Kota Metro sebagai sentra budidaya rambutan di Provinsi Lampung. Kulit buah dan biji rambutan terlebih dahulu dibersihkan lalu dijemur hingga kering dengan bantuan sinar matahari dan diangin-anginkan, kemudian masing-masing diblender hingga halus. Kulit buah dan biji rambutan hasil blender diayak dan menghasilkan masing-masing 300 gram tepung kulit buah dan biji rambutan. Tepung kulit buah dan biji rambutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 5 (w/v) lalu ditutup rapat dan dimaserasi selama 2 x 24 jam. Setelah dilakukan perendaman kemudian larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring dan hasil dari penyaringan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 35° C hingga kering.

## **1.3. Pembuatan Media Isolat**

Media agar yang digunakan sebagai media kultur isolat bakteri adalah TSA dan TSA 2,5% NaCl sebanyak 200 ml. TSA digunakan untuk bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, dan *Streptococcus* sp., sedangkan TSA 2,5 % NaCl untuk bakteri *V. alginolyticus*.

Pembuatan TSA 200 ml adalah dengan menimbang TSA sebanyak 8 gram kemudian dilarutkan menggunakan aquades sebanyak 200 ml ke dalam tabung erlenmeyer, sedangkan untuk TSA 2,5% NaCl ditambahkan NaCl sebanyak 5

gram. TSA yang sudah dilarutkan lalu dipanaskan diatas *hot plate* dengan kecepatan 600-800 rpm dan suhu 200-300° C sampai mendidih dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121° C dan tekanan 1 atm. TSA yang sudah steril lalu dituang ke cawan petri dan didinginkan ke dalam kulkas hingga menjadi agar.

## **2. Tahap Pelaksanaan**

### **2.1. Uji Bakteriostatis**

Uji bakteriostatis dilakukan untuk melihat aktivitas antibakteri dari senyawa ekstrak kasar kulit buah dan biji rambutan terhadap bakteri-bakteri uji. Terdapat 2 uji yang akan dilakukan, yaitu uji cakram dan uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Uji cakram dilakukan untuk melihat seberapa besar daya hambat ekstrak kulit buah dan biji rambutan terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp., *V. alginolyticus*. Uji cakram diujikan dengan metode *paper disk* menggunakan kertas cakram pada media agar TSA. Media agar yang telah ditanam oleh isolat bakteri diletakkan *paper disk* yang telah direndam dengan ekstrak kulit buah dan biji rambutan selama 15 menit pada masing-masing bakteri, kemudian diinkubasi selama 36 jam.

Uji MIC dilakukan sebagai pengujian antibakteri untuk memperoleh konsentrasi terendah dari ekstrak biji rambutan yang dapat menghambat bakteri patogen. Uji MIC dilakukan dengan membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Metode yang digunakan adalah *serial tube dilution* dengan MHB (*Muller Hilton Broth*) sebagai media kultur bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Streptococcus* sp.. Tabung reaksi yang digunakan sebagai wadah diisi MHB sebanyak 4,5 ml lalu ditambahkan 0,5 ml ekstrak kulit buah dan

biji rambutan secara berseri dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% pada masing-masing tabung lalu diinokulasi bakteri dengan kepadatan  $10^7$  cfu/ml, diinkubasi selama 24 jam. Uji MIC menggunakan kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-) sebagai pembanding.

## **2.2. Uji Toksisitas**

Uji toksisitas atau BST (*Brine Shrimp Test*) adalah pengujian terhadap senyawa antibakteri bersifat toksik atau non toksik. Uji BST menggunakan *Artemia* sp. sebagai hewan uji dan ekstrak kulit buah dan biji rambutan sebagai senyawa uji. *Artemia* yang digunakan berumur 48 jam yang diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut Lampung. Uji toksisitas dilakukan pada tabung reaksi dengan volume sebesar 300  $\mu$ L dan artemia sebanyak 20 ekor/tabung. Larutan ekstrak yang dibutuhkan sebesar 150  $\mu$ L dengan perlakuan uji, yaitu kontrol, 0,5 x MIC, 1 x MIC, dan 1,5 x MIC. Setelah itu pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah artemia yang masih hidup dan artemia yang sudah mati. Senyawa akan dinyatakan toksik apabila nilai  $LC_{50} \leq 1000$   $\mu$ g/ml, sebaliknya apabila nilai  $LC_{50} \geq 1000$   $\mu$ g/ml dinyatakan tidak toksik (Juniarti *et al.*, 2009).

## **3. Tahap Pengamatan**

### **3.1. Bakteriostatis**

Parameter yang diamati pada uji sensitifitas yaitu penentuan ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan diameter zona hambat pada media agar yang ditimbulkan oleh ekstrak kulit buah dan biji rambutan terhadap bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp., dan *V. alginolyticus* setelah 24

jam masa inkubasi. Pengamatan pada uji MIC dilakukan secara kualitatif dengan parameter yang diamati adalah tingkat kekeruhan dan batas konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

### **3.2. Tingkat Toksisitas**

Parameter yang diamati yaitu tingkat toksik dari ekstrak biji rambutan, dengan melihat tingkat mortalitas dari *Artemia* berumur 48 jam yang diberi ekstrak biji rambutan lalu dibandingkan dengan nilai LC<sub>50</sub>.

## **4. Analisis Data**

Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dan dibandingkan dengan pustaka yang berhubungan dengan penelitian ini.