

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November sampai Desember 2011 bertempat di Laboratorium Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung dan Laboratorium Budidaya Perikanan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: termometer, *analytical balance*, timbangan digital, mikro pipet, gelas ukur, autoklaf, oven, lemari es, neraca, jangka sorong, mikro pipet, lampu bunsen, inkubator, *colony counter*, cawan petri, tabung reaksi 5 ml, labu erlenmeyer 500 ml dan 250 ml, *spreader*, pipet tetes, jarum *ose*, lampu bunsen, *hot plate*, *strirer magnetic*, semproitan alkohol, aluminium foil, plastik *wreaping*, pisau, blender, saringan, *laminary flow*, botol semprot, corong, kamera digital, mikroskop digital, alat ekstraksi (mixer dan sentrifugate), karet gelang, masker, sarung tangan, pisau, korek api, alat tulis, karung.

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah inokulum murni bakteri *A. salmonicida* dan *V. harveyi*, daun *mangrove*, PBS, media TSA 0% dan TSA 2,5%, Muller Hinton Agar (MHA), NaCl, Alkohol 70%, aluminium

foil, kertas saring, kapas, kertas cakram, kertas pembungkus, kertas label dan aquades steril.

C. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu jenis sampel (S) dan perbedaan pelarut (P).

Faktor 1 : Jenis Sampel

S₁ = pucuk daun/daun segar

S₂ = daun tua

S₃ = daun rontok

Faktor 2 : jenis pelarut

P1= metanol

P2= etil aseta

P3= hexana

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan : X_{ijk} = pengamatan pada taraf ke-i faktor A, taraf ke-j faktor B, dan ulangan ke-k

μ = nilai tengah populasi

α_i = pengaruh tertambah taraf ke-i faktor A yg diukur sbg simpangan dari μ , $\sum \alpha_i = 0$

β_j = pengaruh tertambah taraf ke-j faktor B yg diukur sbg simpangan dari μ , $\sum \beta_j = 0$

$(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh tertambah persitindakan A_i x B_j,
 $\sum (\alpha\beta)_{ij} = \sum (\alpha\beta)_{ij} = 0$

γ_k = pengaruh klompok ke-k

ε_{ijk} = pengaruh galat acak, $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$

D. Prosedur Penelitian

Pelaksanaan penelitian terbagi menjadi 3 tahap, yaitu:

- 1) Tahap persiapan, meliputi: sterilisasi alat dan bahan, penyiapan sampel (ekstrak), penyiapan bakteri kultur .
- 2) Tahapan pelaksanaan, meliputi : uji *in vitro* dengan metode MIC
- 3) Tahap pengamatan: meliputi seberapa lebar daya hambat ekstrak daun *mangrove* (*Rhizophora mucronata*) terhadap bakteri *A. salmonicida* dan *V. harveyi*.

D.1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi merupakan usaha yang dilakukan untuk membebaskan alat dan bahan dari mikroorganisme kontaminan, dapat dilakukan dengan cara mencuci alat dan bahan yang akan digunakan sampai bersih tunggu sampai kering dan bungkus menggunakan kertas kopi, hal ini bertujuan untuk mencegah alat-alat tersebut terkena air, selanjutnya masukan alat-alat tersebut ke dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C, tekanan 1 atm selama 15-20 menit.

b. Penyiapan Sampel (Ekstrak)

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yaitu bagian daun yang akan digunakan adalah pucuk daun, daun tua dan daun kering. Daun dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan pada suhu ruangan dengan bantuan cahaya matahari sampai kering, selanjutnya daun dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan saringan sampai didapatkan bubuk halus. Bubuk daun *mangrove* disimpan dalam tempat tertutup pada suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari langsung.

Proses ekstraksi dilakukan dengan melarutkan 250 gram bubuk daun *mangrove* dan tiga macam larutan yaitu metanol, etil asetat, dan hexan. Campurkan dengan bubuk daun *mangrove*. Kemudian hasil seduhan disaring dengan menggunakan kertas saring supaya didapatkan ekstrak berupa cairan yang siap digunakan.

Pada proses maserasi pelarut akan menembus dinding sel dan akan masuk ke dalam rongga sehingga komponen bioaktif akan larut. Adanya perbedaan konsentrasi diantara larutan komponen bioaktif di dalam sel dengan di luar sel maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali hingga terjadi keseimbangan antara larutan diluar dengan didalam sel (Nur dan Adjuana, 1989).

c. Penyiapan Bakteri Kultur

Bakteri *A. salmonicida* dan *V. harveyi* diambil dari kultur murni (24 jam) lalu diinokulasikan pada media agar yang berbeda dalam cawan petri yang telah diberi label. Isolat dengan kepadatan 10^7 cfu/ml diambil sebanyak 0,1 ml menggunakan mikropipet dan disebar menggunakan batang kaca penyebar kemudian cawan petri diinkubasi selama 24 jam (Meylia, 2010).

D.2. Tahap Pelaksanaan Pengujian Antibakteri

a. Uji *in vitro*

Uji *in vitro* dilakukan untuk melihat aktivitas antibakteri dari ekstrak daun *mangrove* terhadap bakteri *A. salmonicida* dan *V. harveyi* uji ini dilakukan dengan menggunakan uji MIC. MIC merupakan konsentrasi terendah bahan antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Metode pengujian MIC

merupakan salah satu metode yang biasa digunakan dalam pengujian aktivitas zat antimikroba secara *in vitro*.

Metode ini dilakukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah dari zat tersebut yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme yang diuji. Uji MIC dilakukan dengan cara membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm. Metode yang digunakan adalah *serial tube dilution*, mula-mula sediakan tabung reaksi dan masukan media MHB (*muller hilton broth*) sebanyak 4,9 ml dan masukan ekstrak secara berseri dengan konsentrasi berturut-turut 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm pada masing – masing tabung dan inokulasikan bakteri masing – masing dengan kepadatan 10^7 cfu/ml. Juga digunakan kontrol positif (+) dan negatif (-) sebagai pembanding. Setelah waktu inkubasi selama kurang lebih 24 jam, Uji MIC dipengaruhi oleh jenis organisme, ukuran inokulum, komponen media kultur, waktu inkubasi, serta kondisi inkubasi berupa suhu, pH atau aerasi (Schegel and Schmidt, 1994).

Aktivitas antimikroba ditentukan dengan mengukur diameter hambatnya, yaitu daerah bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Antimikroba dikatakan memiliki aktivitas yang tinggi terhadap mikroba apabila nilai konsentrasi penghambatan bakteri yang terendah (MIC) kecil, tetapi mempunyai diameter penghambatannya besar (Irianto, 2007). Suatu bahan dikatakan mempunyai aktivitas antibakteri apabila diameter hambatan yang terbentuk lebih besar atau sama dengan 6 mm (Bell, 1984). Uji antibakteri dilakukan dengan metode *paper disc*. Media TSA yang sudah steril diambil, kemudian biakan

A. salmonicida dan *V. harveyi*. Umur 24 jam ditanam pada TSA, kedua bakteri uji masing-masing diambil sebanyak 1 ml, kemudian suspensi dimasukkan ke dalam cawan petri dan diratakan dengan *grigalsky*, selanjutnya potongan kertas yang telah dicelupkan pada ekstrak daun *mangrove* ditempatkan pada tiap-tiap media bakteri tersebut. Setelah itu semua biakan diinkubasikan selama 24 jam (Meylia, 2010). Setelah 24 jam biakan tersebut diamati ada tidaknya daerah hambatan (daerah jernih yang tidak ditumbuhi bakteri uji), kemudian daerah hambatan yang terbentuk diukur diameternya (diameter keseluruhan dikurangi diameter *paper disc* 6 mm (Ambarwati, 2007). Dari hasil inkubasi uji MIC selanjutnya ditanam pada media TCBS atau TSA 2,5% dengan cara *spreader* dan diamati pertumbuhannya selama kurang lebih 24 jam. Selanjutnya koloni bakteri yang tumbuh dilakukan perhitungan dengan bantuan alat bakteri colony counter.

b. Uji LC-50

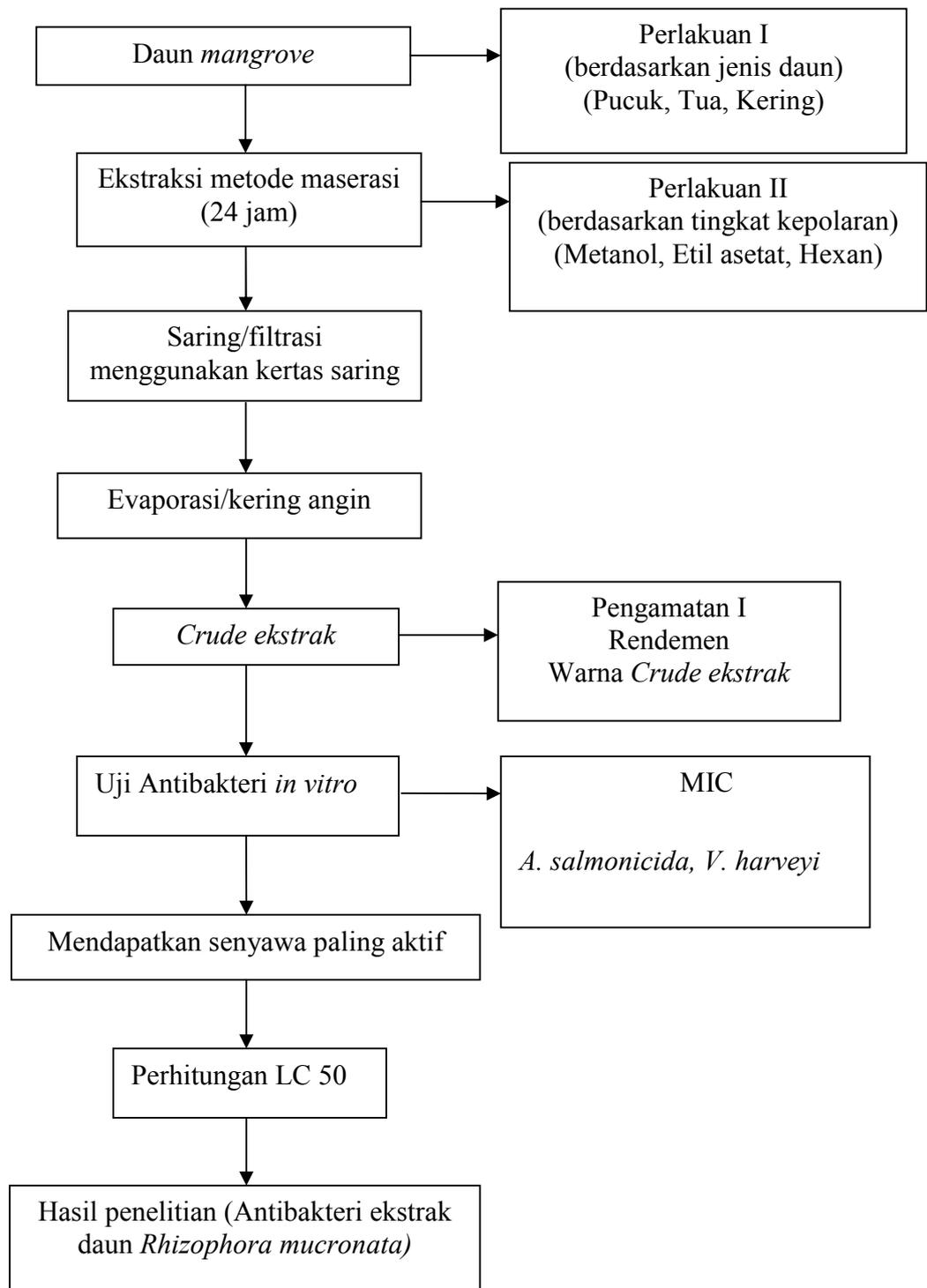
Uji LC-50 dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang dapat menyebabkan kematian bakteri uji sebanyak 50% dari populasi awal, yaitu 10^7 CFU/ml. menggunakan 5 konsentrasi, yaitu 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm. Uji LC 50 dilakukan dengan menggunakan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$b = \frac{\sum xy - \left(\frac{1}{n}\right)\sum x\sum y}{\sum x^2 - \frac{1}{n}(\sum x)^2}$$

$$a = \frac{1}{5}(\sum y - b\sum x)$$

$$m = \frac{5 - a}{b}$$

(Finney, 1971)



Gambar 5. Tahapan penelitian

D.3. Tahap Pengamatan

Tahap pengamatan dilakukan dengan mengamati lebar daya hambat atau zona bening yang terbentuk pada ekstrak daun *mangrove* terhadap bakteri *A. salmonocida* dan *V. harveyi* dan mengamati tingkat kekeruhan pada tabung reaksi dan dilihat pada batas konsentrasi berapa bakteri masih dapat tumbuh pada tabung reaksi.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian (Rendeman, Zona hambat, Uji TPC) dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam pada selang kepercayaan 95%. Apabila dalam analisis didapat hasil yang berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada selang kepercayaan 95%.