

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai September 2012 bertempat di Laboratorium Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung dan Laboratorium Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: timbangan digital, gelas ukur, blender, *vortex* (BOECO, GermanyTM), mikropipette (Nesco®), autoklaf, *vacuum evaporator* (Heidolph), lemari es, jangka sorong 0,05 mm, lampu bunsen, inkubator, cawan petri 150 x 15 mm (Normax®), tabung reaksi 5 ml (Iwaki glassTM), erlenmeyer 500 ml dan 250 ml (Pyrex®), *spreader*, pipet tetes, jarum *ose*, *magnetic stirrer*, *hot plate* (Stuart CB162TM), aluminium foil, plastik tahan panas, kertas kopi, kapas steril, kertas label, masker, karet gelang, sarung tangan, pisau, korek api, kertas saring, kertas cakram, saringan, tisu, corong, mikroskop, wadah penetasan *Artemia salina*, lampu, spektrofotometer (Genesys-20, Thermospectronic), kamera digital, dan alat tulis.

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah inokulum murni bakteri *A. hydrophila*, *E. tarda*, *S. iniae*, dan *P. stutzeri*, ekstrak buah *Rhizophora* sp., kista *Artemia salina*, media TSA (*Trypticase Soy Agar*) (OXOID®), media TSB (*Trypticase Soy Broth*) (OXOID®), media MHB (*Mueller-Hilton Broth*) (OXOID®), alkohol 70%, metanol, heksan, etil asetat dan aquades steril.

C. Metode Penelitian

Pelaksanaan penelitian terbagi menjadi 2 tahap, yaitu:

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi merupakan usaha yang dilakukan untuk membebaskan alat dan bahan dari mikroorganisme kontaminan. Sterilisasi dapat dilakukan dengan cara mencuci alat dan bahan yang akan digunakan sampai bersih. Setelah kering, alat-alat dibungkus 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. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Buah dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan pada suhu ruangan sampai kering, selanjutnya buah dihaluskan dengan blender dan diayak dengan saringan sampai didapatkan bubuk halus.

Proses ekstraksi dilakukan dengan melarutkan 500 gram bubuk buah *Rhizophora* sp. dengan 3 jenis larutan yaitu hexan, etil asetat dan metanol

masing-masing sebanyak 2500 ml. Kemudian hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring dan dievaporasi menggunakan *vacum evaporator* dan didapatkan ekstrak buah *Rhizophora* sp.

c. Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri uji yang akan digunakan pada penelitian ini adalah *E. tarda*, *S. iniae*, dan *A. hydrophila* yang berasal dari Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan, Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas bertujuan untuk mengetahui potensi antibakteri yang terkandung di dalam ekstrak buah *Rhizophora* sp. dengan konsentrasi 100 % yang dilarutkan menggunakan 3 pelarut berbeda terhadap bakteri *A. hydrophilla*, *E. tarda*, *P. stutzeri*, dan *S. iniae*. Uji sensitivitas dilakukan dengan menggunakan metode difusi (*Diffusion Test*) menggunakan kertas cakram. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode kertas cakram ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Sebanyak 20 μ l isolat cair bakteri uji masing – masing dengan kepadatan 10^7 cfu/ml diinokulasikan pada media TSA dan diratakan dengan *spreader*. Kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah direndam di dalam ekstrak buah *Rhizophora* sp yang dilarutkan dengan 3 jenis pelarut berbeda (heksana, etil asetat dan methanol) selama 15 menit, kemudian diletakkan pada permukaan media TSA, lalu media TSA diinkubasi selama 18-24 jam. Pengamatan Uji sensitivitas dilakukan dengan melihat zona hambat ekstrak buah

Rhizophora sp. yang terbentuk terhadap bakteri *A. hydrophilla*, *E. tarda*, *P. stutzeri*, dan *S. iniae*. Hasil dari uji sensitivitas yang menunjukkan diameter terbesar dari 1 pelarut ke 1 bakteri yang akan dipakai di dalam uji zona hambat.

b. Uji Zona Hambat

Uji zona hambat dilakukan dengan menggunakan metode difusi (*Diffusion Test*) menggunakan kertas cakram. Uji zona hambat dilakukan berdasarkan hasil dari uji sensitivitas ekstrak buah *Rhizophora* sp. yang menunjukan potensi antibakteri. Sebanyak 20 μ l isolat cair bakteri yg ditentukan dari uji sensitivitas dengan hasil diameter zona hambat terbesar dengan kepadatan 10^7 cfu/ml ditetaskan pada media TSA lalu diratakan dengan *spreader*. Kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah direndam di dalam ekstrak buah *Rhizophora* sp. pada konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 mg/l selama 15 menit, kemudian diletakkan pada permukaan media TSA. Kontrol positif dilakukan dengan memberikan kertas cakram berisi antibiotik *oxytetracycline*, sedangkan kontrol negatif berupa kertas cakram netral (hanya diberi akuades). Setelah masa inkubasi, kemudian diamati dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram tersebut dengan jangka sorong.

c. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Uji MIC dilakukan berdasarkan hasil uji zona hambat. Uji MIC bertujuan untuk mencari konsentrasi terendah bahan anti bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Metode Penentuan MIC langkah awal yang dilakukan yaitu disiapkan tabung reaksi steril dan dimasukkan 4,5 ml media MHB ke dalam masing-masing tabung reaksi. Ekstrak buah *Rhizophora* sp. dengan konsentrasi

100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/l dan kontrol, kontrol positif berupa antibiotik *oxytetracycline*, sedangkan kontrol negatif hanya diberi bakteri, dimasukkan sebanyak 0,5 ml ke dalam masing-masing tabung reaksi. Kemudian suspensi bakteri uji dengan kepadatan 10^7 cfu/ml sebanyak 0,1 ml ditambahkan kedalam masing-masing tabung reaksi dan divortek hingga homogen. Media MHB diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hasil pengamatan dibandingkan dengan larutan pembanding (larutan MHB dicampur ekstrak buah *Rhizophora* tanpa ditambah bakteri) sehingga dapat diketahui adanya media yang mulai bening/jernih yang menunjukkan nilai MIC. Nilai-nilai MIC ditafsirkan sebagai pengenceran tertinggi dan konsentrasi terendah (Wilson, 2005).

Pengamatan uji MIC dilakukan dengan melihat kekeruhan media MHB yang telah diberi ekstrak buah *Rhizophora* sp.

d. Uji MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Penentuan MBC dapat dilakukan setelah menginokulasikan larutan dari tabung MIC terjernih pada media. Diambil 0,1 ml suspensi bakteri dari tabung pada perlakuan yang menunjukkan nilai MIC sampai konsentrasi sebesar 100%, kemudian ditumbuhkan dalam medium TSA. Diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada medium TSA. Nilai MBC ditentukan dari konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni pada cawan petri. Pengamatan uji MBC dilakukan dengan melihat konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni pada cawan petri.

e. Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT digunakan untuk mempelajari toksisitas sampel secara umum dengan menggunakan *Artemia salina*.

Penetasan Kista *A. salina*.

Wadah berbentuk kerucut disiapkan untuk penetasan kista *A. salina*. Lampu diletakkan di atas wadah untuk menghangatkan suhu dalam penetasan. Wadah diisi air laut dan diberi aerasi, kemudian dimasukan kista *A. salina* sebanyak 1 gr. Lampu dinyalakan selama 48 jam untuk menetas kista. Setelah menetas larva *A. salina* diambil dengan pipet.

Persiapan Larutan Sampel yang akan diuji.

Larutan sampel yang akan diuji dibuat dengan perbandingan 0,5 : 1 : 1,5 : 2 : 2,5 : 3 kali dari konsentrasi hasil terbaik uji MIC.

Prosedur Uji Toksisitas dengan Metode BSLT.

Larutan sampel yang akan diuji masing-masing perbandingan konsentrasi 0,5 : 1 : 1,5 : 2 : 2,5 : 3. Setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel. Penambahan larutan ekstrak dan air laut sampai volume 2 ml. Larva *A. salina* dimasukkan masing-masing 20 ekor dengan menggunakan pipet ke dalam wadah uji. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang hidup dan mati dari tiap perlakuan.

Selanjutnya dihitung mortalitas *A. salina*. Grafik dibuat dengan log konsentrasi sebagai sumbu x terhadap mortalitas sebagai sumbu y. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50% yang diperoleh dengan

memakai persamaan regresi linier $y = a + bx$. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $LC_{50} < 1000$ ppm untuk ekstrak (Juniarti, 2011).

$$Mortalitas = \frac{\text{akumulasi mati}}{\text{Jumlah akumulasi total}} \times 100\%$$

f. Uji *Inhibition Time Course*

Uji *inhibition time course* bertujuan untuk melihat waktu ekstrak *Rhizopora* sp. dapat menghambat bakteri. Langkah awal dalam uji *inhibition time course* pertama membuat media TSB dengan aquades steril, dimasukan kedalam tabung erlemayer masing – masing sebanyak 50 ml, kemudian ekstrak dimasukan kedalam masing – masing tabung erlenmayer sehingga dosis ekstrak menjadi 1 MIC, 2 MIC, dan 3 MIC, dengan kontrol positif menggunakan *oxytetracycline*, dan kontrol negatif tanpa pemberian antibiotik. Kemudian, sebanyak 50 µl dengan kepadatan 10^5 sel/ml inokulasi bakteri yang telah disiapkan 1 hari sebelumnya dimasukan kedalam erlenmayer. Pengamatan dilakukan setiap 3 jam selama 24 jam, pengamatan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer. Pengamatan Uji *Inhibition Time Course* dilakukan dengan menghitung kepadatan bakteri dengan menggunakan alat spektrofotometer.