

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium mengenai efektivitas ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

B. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, dan Laboratorium penelitian Universitas Ahmad Dahlan pada bulan Oktober 2017 – Desember 2018.

C. IDENTIFIKASI VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel bebas

Ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*)

2. Variabel tergantung

Kadar Hambat Minimum (KHM) dan diameter zona hambat

3. Variabel terkontrol

- a) Bakteri *Escherichia coli*
- b) Jumlah bakteri
- c) Media pertumbuhan bakteri
- d) Waktu inkubasi 24 jam
- e) Suhu inkubasi 37°C

4. Variabel tidak terkontrol

Zat aktif dalam buah pedada (*Sonneratia caseolaris*)

D. DEFINISI OPERASIONAL

Buah pedada termasuk ke dalam kelas Angiospermae, tumbuhan biji terbuka yang memiliki propagule atau bakal buah yang sangat unik. Buah pedada termasuk kedalam keluarga (*Sonneratiaceae*). Memiliki kemampuan mengapung dan memiliki akar napas untuk membantu dalam proses respirasi serta reproduksinya polinasi yang dipengaruhi oleh serangga dan angin (Varghese *et al.* 2010).

Buah pedada yang digunakan adalah yang sudah dewasa atau matang memiliki warna hijau terang , dan dipilih buah yang tidak berlubang sehingga bersih dari hama ulat, buah pedada dipilih dan diambil pada bulan agustus 2018 di Taman Mangrove Kabupaten Tana Tidung Kalimantan Utara.

Escherichia coli bakteri gram negatif berbentuk batang atau basil pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameternya sekitar 0,7 μm , lebar 0,4 – 0,7 μm dan bersifat anaerob, pengujian di Balai Laboratorium Kesehatan yogyakarta september 2018 dengan hasil uji isolasi dan identifikasi biakan murni sesuai dengan karakteristik strain *Escherichia coli* ATCC 25922.

E. INSTRUMEN PENELITIAN

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah blender, peralatan maserasi botol coklat, erlenmeyer (SCHOT Duran), corong, kertas saring, kapas, aluminium-foil (klinik pak), label, lemari pendingin, gelas kimia, gelas ukur, alat vakum, *rotari evaporator*, alat-alat gelas, timbangan analitik, ose, pinset, inkubator, *biosafety cabinet* , *hot plate*, autoklaf dan tabung raksi.

2. Bahan

1. Bahan uji

Sampel yang digunakan sebagai bahan uji adalah simplisia kering buah pedada *Sonneratia caseolaris* yang diperoleh dari Kalimantan Utara tepatnya di Taman Mangrove Kabupaten Tana Tidung dan determinasi di lakukan di laboratorium biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan.

2. Bahan Kimia

Pelarut etanol 96%, besi III klorida (FeCl_3), kloroform, natrium hidroksida (NaOH), NaCl fisiologis dan DMSO (dimetil sulfoksida) .

3. Bahan uji antimikroba

Mikroba uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922. Adapun antibiotik pembanding adalah kotrimoksazol. Media yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA).

F. CARA KERJA

1. Penyiapan Bahan

Sampel yang digunakan adalah buah pedada (*Sonneratia caseolaris*) yang diperoleh dari Taman Mangrove Kabupaten Tana Tidung Kalimantan Utara, dalam keadaan sampel yang masih segar, dan identitas biologi tumbuhan ini ditentukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan.

Selanjutnya dilakukan sortasi basah serta dicuci untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel pada bahan. Sortasi dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji, setelah itu buah di potong menjadi bagian-bagian kecil dikeringkan di bawah sinar

matahari selama 5 hari. Buah yang sudah dikeringkan didapatkan sebanyak 2,5 kilogram.

Simplisia yang telah kering disortasi kembali dari kotoran-kotoran yang tertinggal, Simplisia yang telah disortir, kemudian diblender menjadi serbuk halus.

2. Pembuatan ekstrak

Serbuk simplisia dari buah *Sonneratia caseolaris* yang digunakan dalam percobaan sebanyak 2 kilogram dimasukkan kedalam alat maserasi (botol kaca). Ekstrak dibuat dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut yaitu etanol 96% (Proses maserasi didiamkan selama 5 hari sambil sesekali dilakukan pengadukan). Setelah 5 hari maserat disaring dengan menggunakan corong yang dilapiskan dengan kapas selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring agar tersaring sempurna.

3. Rendemen total Ekstrak *Sonneratia caseolaris*

Rendemen ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*) total dihitung dengan menbandingkan berat awal serbuk simplisia dengan berat akhir ekstrak buah *Sonneratia caseolaris* total yang diperoleh .

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak total yang diperoleh}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

4. Uji Kadar Etanol

Pada Farmakope Indonesia Edisi Keempat ada 2 metode yang digunakan dalam menentukan kadar etanol yaitu metode destilasi dan metode kromatografi. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah destilasi, kadar etanol ditetapkan dari bobot jenis destilat yang dihasilkan, Berat jenis larutan etanol dapat diukur dengan piknometer. Berat jenis ekstrak etanol semakin kecil, maka kadar etanol di dalam larutan tersebut semakin besar. Hal

ini dikarenakan etanol mempunyai berat jenis yang lebih kecil daripada air sehingga semakin kecil berat jenis larutan berarti jumlah atau kadar etanol semakin banyak (Depkes 1995). Konversi berat jenis menjadi kadar etanol (v/v) disajikan pada tabel daftar bobot jenis dan kadar etanol, seperti dibawah ini :

Tabel 3.2 Konversi berat jenis – kadar etanol (v/v)

Berat jenis larutan etanol	Kadar Etanol (% v/v)	Berat jenis Larutan etanol	Kadar Etanol (% v/v)	Berat jenis Larutan etanol	Kadar Etanol (% v/v)
1,000	0,00	0,9978	1,48	0,9956	2,98
0,9999	0,07	0,9977	1,54	0,9955	3,05
0,9998	0,13	0,9976	1,61	0,9954	3,12
0,9997	0,20	0,9975	1,68	0,9953	3,19
0,9996	0,26	0,9974	1,75	0,9952	3,26
0,9995	0,33	0,9973	1,81	0,9951	3,33
0,9994	0,40	0,9972	1,88	0,9950	3,40
0,9993	0,46	0,9971	1,95	0,9949	3,47
0,9992	0,53	0,9970	2,02	0,9948	3,54
0,9991	0,60	0,9969	2,09	0,9947	3,61
0,9990	0,66	0,9968	2,15	0,9946	3,68
0,9989	0,73	0,9967	2,22	0,9945	3,76
0,9988	0,80	0,9966	2,29	0,9944	3,83
0,9987	0,87	0,9965	2,37	0,9943	3,90
0,9986	0,93	0,9964	2,43	0,9942	3,97
0,9985	1,00	0,9963	2,50	0,9941	4,04
0,9984	1,07	0,9962	2,57	0,9940	4,11
0,9983	1,14	0,9961	2,64	0,9939	4,18
0,9982	1,20	0,9960	2,70	0,9938	4,26
0,9981	1,27	0,9959	2,77	0,9937	4,33
0,9980	1,34	0,9958	2,84	0,9936	4,40
0,9979	1,41	0,9957	2,91	0,9935	4,48

Sumber : Depkes 1995, Farmakope Indonesia Edisi IV.

5. Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak buah pedada (*Soneratia caseolaris*)

5.1 Strerilisasi Alat

Alat-alat gelas dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit, ose dan pinset dibakar dengan pembakaran diatas api, sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan zat dan mikroba pengganggu.

5.2 Pembuatan Medium

a. Medium *Nutrient Agar* (NA)

Dalam metode ini medium NA di buat adalah sebanyak 10 cawan petri, setiap cawan petri berisi 15 ml. NA ditimbang sebanyak 4.2 gram dilarutkan dalam 150 ml aquades. Setelah semua bahan tercampur, medium dipanaskan hingga larut sempurna, lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dimasukkan kedalam petri yang telah disiapkan.

5.3 Persiapan Inokulum

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli*

a. Peremajaan bakteri

Bakteri uji di remajakan pada medium *Nutrien Agar* (NA) miring steril. Mikroba uji diinokulasi sebanyak satu ose ke dalam medium NA dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Peremajaan dilakukan dalam kondisi steril didalam *Biosafety cabinet* (BSC).

b. Pembuatan suspensi Bakteri

Bakteri uji yang telah diremajakan diambil satu ose kemudian disuspensikan ke dalam 15 ml larutan NaCl 0.9 % steril, setelah itu dihomogenkan.

5.4 Penyiapan larutan uji

Pembuatan larutan uji pada penelitian ini dilakukan dengan membuat variasi kadar konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, dan 80% sebagai larutan uji. Pembuatan variasi konsentrasi ini dilakukan dengan cara menimbang 0,2 gram, 0,4 gram, 0,6 gram dan 0,8 gram ekstrak kental dan dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 ml.

5.5 Pembuatan larutan kontrol positif

Pada uji aktifitas antibakteri ekstrak pedada digunakan 1 mg kotrimoksazol sebagai kontrol positif, kotrimoksazol dilarutkan dalam 1 ml aquades steril kemudian di vortex hingga homogen.

5.6 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

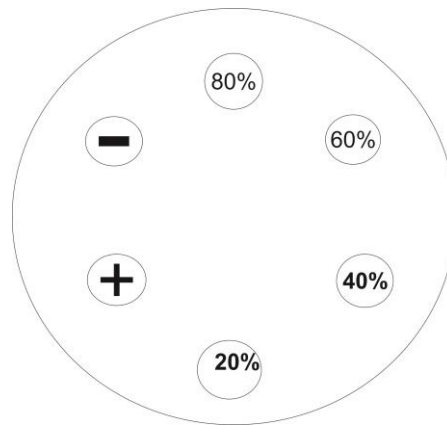
Dalam metode ini karena pelarut yang digunakan untuk membuat konsentrasi ekstrak adalah DMSO (*Dimetil Sulfoksida*), maka kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5%, volume larutan kontrol negatif yang ingin di buat adalah 1 ml, maka diambil DMSO sebanyak 50 μ l, di larutkan dalam aquades sebanyak 950 μ l kemudian di vortex hingga homogen.

5.7 Penentuan Aktivitas Antimikroba ekstrak *Sonneratia caseolaris* terhadap mikroba uji.

Metode yang digunakan pada uji aktifitas antibakteri buah pedada adalah metode sumuran. Metode sumur dilakukan dengan menyiapkan cawan petri steril yang berisi medium NA, larutan uji, larutan kontrol negatif, dan larutan antibiotik pembanding sebagai kontrol positif. Pengujian dilakukan di dalam BSC (*biological safety cabinet*), kemudian 3 cawan petri

yang telah berisi medium NA diusap kan larutan suspensi bakteri secara merata dengan menggunakan *cotton bud* yang telah disterilkan.

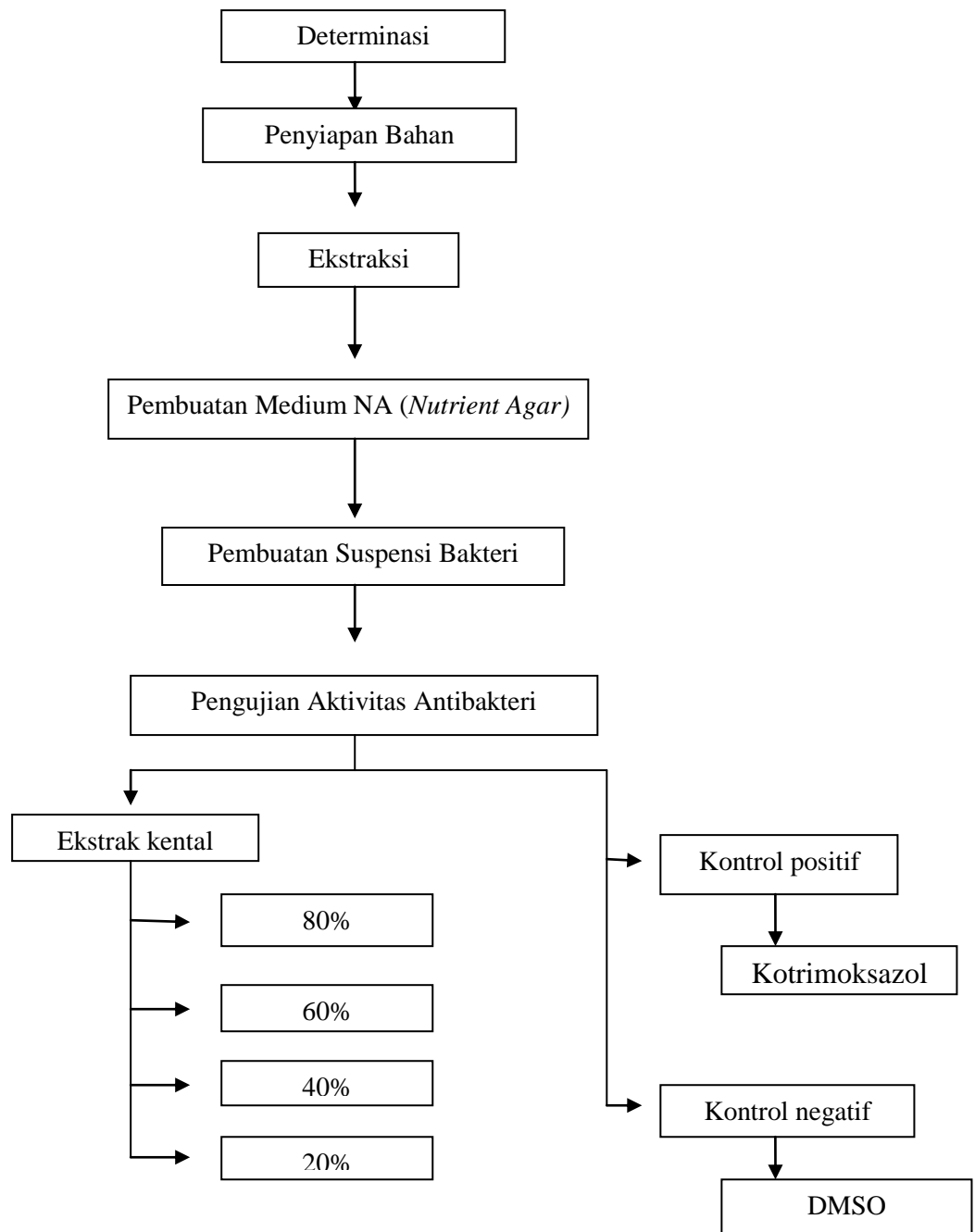
Cawan petri yang telah berisi media agar diberi lubang, masing-masing cawan berisi 6 lubang. Pembagian lubang ekstrak uji dan larutan kontrol dalam cawan petri seperti pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Pembagian lubang pada cawan petri

Setiap lubang dimasukkan larutan konsentrasi sesuai dengan lubang yang telah ditetapkan, menggunakan mikropipet sebanyak 20 μ l, setelah itu cawan yang telah di berikan larutan uji dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati dan diukur daerah hambatnya.

6. Skema Langkah Kerja



7. Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dengan membuat tabel hasil, kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS dengan uji analisis statistik *Kruskal Wallis* membandingkan nilai diameter zona hambat ekstrak buah pedada (*Sonneratia caseolaris*) terhadap bakteri *Escherichia coli*, dari setiap konsentrasi ekstrak dan kontrol positif Kotrimoksazol.