

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Menurut penelitian eksperimental merupakan prosedur penelitian yang dilakukan untuk mengungkapkan hubungan sebab akibat dua variabel atau lebih, dengan mengendalikan pengaruh variabel yang lain. Penelitian eksperimental berkaitan dengan pengujian suatu hipotesis dalam mencari pengaruh, hubungan, perbedaan perubahan dari suatu pengujian yang menggunakan perlakuan (Sugiyono, 2012). Berdasarkan pengertian diatas dapat dikatakan bahwa penelitian eksperimental merupakan penelitian yang dilakukan dengan cara uji coba atau perlakuan terhadap variabel yang ditentukan oleh peneliti.

Tahap penelitian dibagi menjadi 3 tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, tahap perlakuan. Tahap persiapan dilakukan dengan cara penentuan lokasi sampling, pengambilan sampel kulit akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata*, persiapan alat dan bahan, dan pembuatan reagen dan media. Tahap pelaksanaan dilakukan dengan cara proses ekstraksi kulit akar *A. alba* dan *R. apiculata*, peremajaan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 12028, dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, pembuatan kurva tumbuh bakteri, pembuatan kurva baku bakteri, uji pendahuluan antibakteri. Tahap perlakuan dilakukan dengan cara pengujian antibakteri ekstrak *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata* terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *S. typhi*, dan *S. aureus*.

1.2. Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga Mei 2018 di Laboratorium Riset dan Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

1.3. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan General Faktorial (Zar, 1984). Menggunakan desain Rancangan General Faktorial karena penelitian dilakukan dengan menggunakan tiga faktor variabel independen yaitu konsentrasi ekstrak kulit akar, jenis kulit akar, dan jenis bakteri. Penelitian dilakukan di laboratorium dengan kondisi lingkungan yang relatif homogen. Penelitian dilakukan pada bakteri patogen ikan, yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan ekstrak kulit akar mangrove *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata* yang didapatkan dari Kawasan Hutan Taman Cagar Alam Leuweung Sancang, Cibalong, Kabupaten Garut. Variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas: Ekstrak kulit akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata*, konsentrasi ekstrak kulit akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata*, dan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus*.
2. Variabel terikat: Besarnya zona hambat pada uji aktivitas antibakteri

Penelitian diawali dengan ekstraksi, ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Pembuatan kurva tumbuh dan kurva baku dilakukan sebelum melakukan uji antibakteri. Uji antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode *disc-diffusion* (Cappucino & Sherman).

Konsentrasi yang akan digunakan untuk uji antibakteri ekstrak kulit akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata* ditentukan berdasarkan uji pendahuluan. Uji pendahuluan dilakukan mengacu pada jurnal penelitian Mulyani, dkk. (2013) dengan menggunakan konsentrasi dengan satuan ppm dan membuat 5 macam konsentrasi ekstrak, konsentrasi ekstrak pada uji pendahuluan terdapat pada lampiran 4.

Berdasarkan uji pendahuluan, masing-masing konsentrasi ekstrak kulit akar *A. alba* dan *R. apiculata* yaitu 2%, 4%, 8%, 16%, dan 20%. Kontrol positif tetracyclin 0,01% dan kontrol negatif DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) 100% untuk ekstrak *A. alba* dan

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

DMSO 10% untuk ekstrak *R. apiculata*. Setiap perlakuan dalam penelitian mendapatkan pengulangan yang diperoleh dari rumus Gomez & Gomez (1984) yaitu: $(t-1)(r-1) \geq 15$, dimana t adalah perlakuan dan r adalah banyaknya pengulangan, sehingga:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

$$6(r-1) \geq 15$$

$$r \geq 3,5 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus, maka pada pengujian antibakteri dilakukan sebanyak 4 kali, namun peneliti melakukan 5 kali pengulangan agar mendapatkan hasil yang lebih akurat. Parameter yang akan diukur dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat dari ekstrak kulit akar *A. alba* dan *R. apiculata*. Data dari hasil perhitungan diameter zona hambat kedua ekstrak kulit akar kemudian diolah dengan menggunakan SPSS versi 16 *for windows*. Berdasarkan Zar (1984) desain rancangan percobaan penelitian terdapat pada tabel 3.1.

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Tabel 3.1.
Desain Rancangan Percobaan Penelitian

		a1	a2	a3
c1	b1	a1b1c1	a2b1c1	a3b1c1
	b2	a1b2c1	a2b2c1	a3b2c1
	b3	a1b3c1	a2b3c1	a3b3c1
	b4	a1b4c1	a2b4c1	a3b4c1
	b5	a1b5c1	a2b5c1	a3b5c1
	b6	a1b6c1	a2b6c1	a3b6c1
	b7	a1b7c1	a2b7c1	a3b7c1
c2	b1	a1b1c2	a2b1c2	a3b1c2
	b2	a1b2c2	a2b2c2	a3b2c2
	b3	a1b3c2	a2b3c2	a3b3c2
	b4	a1b4c2	a2b4c2	a3b4c2
	b5	a1b5c2	a2b5c2	a3b5c2
	b6	a1b6c2	a2b6c2	a3b6c2
	b7	a1b7c2	a2b7c2	a3b7c2

Keterangan:

a1: Jenis bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

a2: Jenis bakteri *Salmonella typhi*

a3: Jenis bakteri *Staphylococcus aureus*

b1: Konsentrasi mangrove 2%

b2: Konsentrasi mangrove 4%

b3: Konsentrasi mangrove 8%

b4: Konsentrasi mangrove 16%

b5: Konsentrasi mangrove 20%

b6: Kontrol positif tetracyclin

b7: Kontrol negatif DMSO

c1: Jenis mangrove *Avicennia alba*

c2: Jenis mangrove *Rhizophora apiculata*

a1b1c1-a3b7c2: Diameter zona hambatan

Amanda Adisty, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

1.4. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah ekstrak kulit akar mangrove yang berpotensi sebagai senyawa antibakteri. Sedangkan sampel penelitian yang digunakan adalah ekstrak kulit akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata* dengan beberapa konsentrasi yang digunakan untuk melihat aktivitas antiakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus*.

1.5. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat yang ditempatkan di laboratorium Riset dan Bioteknologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan terdapat pada lampiran 3.

1.6. Langkah Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap perlakuan.

1.6.1. Tahap Persiapan

1.6.1.1. Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel dan Pengukuran Parameter Lingkungan Sampel Kulit Akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata*

Penentuan lokasi pengambilan data ditentukan berdasarkan dominansi tumbuhan di zona yang akan disampling, tujuannya agar kelestarian cagar alam tetap terjaga. Pengukuran parameter lingkungan dilakukan dilokasi pengambilan sampel yang sudah ditentukan. Parameter lingkungan berupa intensitas cahaya, pH air, pH sedimen, suhu air, suhu sedimen, suhu udara, salinitas, alkalinitas, dan DO. Seluruh parameter diukur dengan 3 kali pengulangan. Data pengukuran terdapat pada lampiran 5.

1.6.1.2. Pengambilan Sampel Kulit Akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata*

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

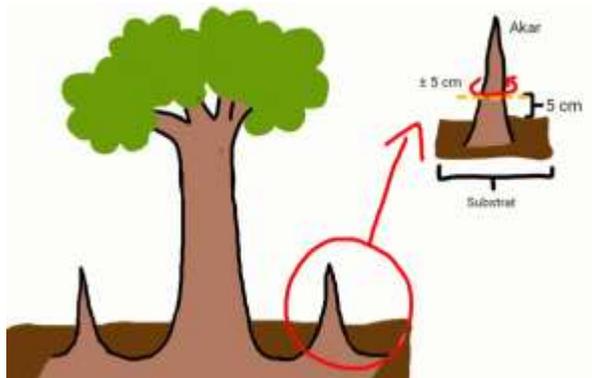
Adapun sebelum pengambilan sampel kulit akar, dilakukan identifikasi terhadap tumbuhan yang akan disampling kulit akarnya, serta parameter lingkungan dicatat. Pengambilan sampel kulit akar ditentukan berdasarkan kondisi ekosistem dan kelimpahan yang

Amanda Adistya, 2018

***PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN
Rhizophora apiculata TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN
IKAN***

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

baik. Ilustrasi pengambilan sampel kulit akar *A. alba* dan *R. apiculata* dapat dilihat pada gambar 3.1 dan 3.2.



Gambar 3.1. Ilustrasi pengambilan sampel kulit akar *Avicennia alba*

Pengambilan sampel kulit akar *Avicennia alba* pada gambar 3.1. dilakukan dengan cara akar diambil dari bagian akar nafas yang muncul dipermukaan sedimen. Ketentuan akar yang akan disampling adalah akar yang memiliki keliling ± 5 cm yang diukur dari permukaan sedimen setinggi 5 cm. Ketentuan akar yang disampling diukur dari besarnya keliling dikarenakan pada akar tumbuhan *A. alba* yang memiliki keliling ± 5 cm memiliki kandungan bioaktif lebih berlimpah dibandingkan dengan akar yang memiliki keliling lebih dari ± 5 cm (Darlian, dkk. 2011).

Pengambilan sampel kulit akar *Rhizophora apiculata* pada gambar 3.2. dilakukan dengan cara kulit akar diambil dari akar tunjang yang berada di atas permukaan sedimen setinggi 5 cm, kulit akar

Amanda Adisty, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

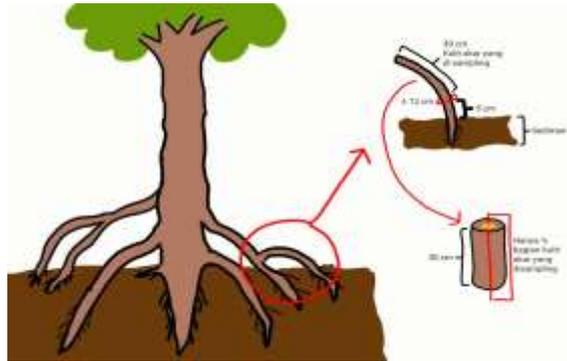
yang akan disampling adalah akar yang mempunyai keliling ± 12 cm dan pengambilang sampel diambil hanya $\frac{1}{2}$ dari keliling akar dan panjang sampel yang diambil hanya 30 cm per akarnya. Sampel yang telah diambil, ditimbang beratnya hingga 500 g per jenis mangrove. Selanjutnya sampel dicuci menggunakan

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

akuades steril hingga sisa sedimen yang berada di kulit akar hilang (Darlian, dkk. 2011).



Gambar 3.2. Ilustrasi pengambilan sampel kulit akar *Rhizophora apiculata*

1.6.1.3. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang sudah tertera pada lampiran 3 dipersiapkan dan dibersihkan. Alat dan bahan yang dapat disterilkan dicuci bersih, dikeringkan, dibungkus menggunakan kertas dan plastik anti panas lalu disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C , tekanan 1 atm dan dalam waktu 15 menit.

1.6.2. Tahap Pelaksanaan

1.6.2.1. Pembuatan Serbuk Kulit Akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata*

Kulit akar *A. alba* dan *R. apiculata* dikeringkan selama 14 hari dalam suhu ruang ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) dan keadaan ruangan gelap. Setelah kering, kulit akar *A. alba* dan *R. apiculata* dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk. Serbuk disaring menggunakan saringan berukuran 100 mesh (Moovendhan, dkk. 2014)

1.6.2.2. Ekstraksi

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Serbuk kulit akar *A. alba* dan *R. apiculata* ditimbang sebanyak 50 g, lalu dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Etanol *pro analyst* ditambahkan sebanyak 300 ml ke dalam masing-masing *beaker glass* yang telah berisi 50 g serbuk *A. alba* dan *R. apiculata*.

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Diamkan dalam keadaan tertutup selama 24 jam dalam suhu ruangan (Darlian, dkk. 2011). Setelah 24 jam larutan dihomogenkan menggunakan shaker (154 rpm) selama 1 jam. Dilakukan penyaringan untuk memisahkan maserat dan residu dengan menggunakan kertas saring Whatmann filter No. 1. Maserat yang dihasilkan ditimbang dan disimpan di suhu 4°C. Residu yang tidak tersaring di remaserasi dengan penambahan Ethanol *pro analyst* 300 ml. Tahap remaserasi dilakukan serupa dengan tahap maserasi. Setelah hasil maserat pertama dan kedua selesai, masing-masing maserat *A. alba* dan *R. apiculata* dievaporasi di suhu 50°C sampai maserat berbentuk pasta (ekstrak kental). Ekstrak *A. alba* dan *R. apiculata* ditimbang dan dicatat (Harborne, 2006).

1.6.2.3. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak

Hasil ekstrak kental (pasta) pada proses ekstraksi *A. alba* sejumlah 4,1 g dan *R. apiculata* sejumlah 14,15 g dibuat stok larutan. Pembuatan konsentrasi ekstrak *A. alba* dilakukan dengan cara ekstrak kental (pasta) *A. alba* dilarutkan dengan larutan DMSO (*Dimetyl sulfoxide*) 100% sebanyak 1 ml secara bertahap hingga seluruh ekstrak kental dapat larut dalam DMSO 100%, sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak *A. alba* sebesar 100%. Ekstrak *R. apiculata* dilarutkan ke dalam DMSO 10% sebanyak 1 ml secara bertahap hingga seluruh ekstrak kental dapat larut dalam DMSO 10%, sehingga didapatkan konsentrasi 50% selanjutnya konsentrasi ekstrak *A. alba* 100% dan *R. apiculata* 100% dibuatkan stok ekstrak dengan konsentrasi 50% hal ini bertujuan agar ekstrak tidak mengkristal karena terlalu pekat. Berikut adalah perhitungan pembuatan DMSO 10%, konsentrasi larutan stok ekstrak *A. alba* dan *R. apiculata* 50%:

1) Pembuatan larutan DMSO 10%

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Pembuatan larutan DMSO 10% dilakukan dengan metode pengenceran. Diambil larutan DMSO 100%, lalu dilakukan pengenceran dengan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$10 \text{ ml} \times 100 = V_2 \times 10$$

$$V_2 = \frac{1000}{10}$$

$$V_2 = 100 \text{ ml}$$

Keterangan: V_1 = volume awal
 N_1 = konsentrasi zat awal
 V_2 = Volume setelah pengenceran
 N_2 = Konsentrasi setelah pengenceran

Berdasarkan hasil perhitungan maka larutan DMSO 100% sebanyak 10 ml ditambahkan dengan akuades steril hingga volume total sebanyak 100 ml, sehingga didapatkan larutan DMSO dengan konsentrasi 10%

2) Pembuatan stok 50% konsentrasi *Avicennia alba*

Pembuatan stok 50% konsentrasi *Avicennia alba* dilakukan dengan metode pengenceran. Diambil konsentrasi 100% ekstrak *A. alba* yaitu sebanyak 8 ml, lalu dilakukan pengenceran dengan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$8 \text{ ml} \times 100 = V_2 \times 50$$

$$V_2 = \frac{800}{50}$$

$$V_2 = 16 \text{ ml}$$

Keterangan: V_1 = volume awal
 N_1 = konsentrasi zat awal
 V_2 = Volume setelah pengenceran

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
 perpustakaan.upi.edu

N_2 = Konsentrasi setelah pengenceran

Berdasarkan hasil perhitungan maka konsentrasi 100% ekstrak *A. alba* sebanyak 8 ml ditambahkan dengan larutan DMSO 100% hingga volume total sebanyak 16 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 50% ekstrak *A. alba*.

3) Pembuatan stok 50% konsentrasi *Rhizophora apiculata*

Pembuatan stok 50% konsentrasi *R. apiculata* dilakukan dengan metode pengenceran. Diambil konsentrasi 100% ekstrak *R. apiculata* yaitu sebanyak 28 ml, lalu dilakukan pengenceran dengan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$28 \text{ ml} \times 100 = V_2 \times 50$$

$$V_2 = \frac{2800}{50}$$

$$V_2 = 56 \text{ ml}$$

Keterangan: V_1 = volume awal

N_1 = konsentrasi zat awal

V_2 = Volume setelah pengenceran

N_2 = Konsentrasi setelah pengenceran

Berdasarkan hasil perhitungan maka konsentrasi 100% ekstrak *R. apiculata* sebanyak 28 ml ditambahkan dengan larutan DMSO 10% hingga volume total sebanyak 56 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 50% ekstrak *R. apiculata*

1.6.2.4. Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan di Bandung (BBPOM) dilakukan peremajaan bakteri selama 1 kali per bulan. Isolat bakteri yang akan diremajakan disiapkan dan dilakukan subkultur secara aseptik ke dalam media

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Nutrient Agar (NA) miring menggunakan jarum inokulasi steril. Setelah itu tabung NA ditutup dengan menggunakan kapas lemak dan dilapisi plastik wrap. Isolat bakteri diberi label dengan format jenis bakteri dan tanggal pengulturan bakteri. Peremajaan bakteri dilakukan di dalam *Laminar air flow* agar tidak terjadi kontaminasi kultur. Isolat bakteri yang sudah disubkultur disimpan di inkubator 37°C selama 2-3 hari. Setelah bakteri tumbuh, isolat bakteri disimpan di dalam lemari es untuk dijadikan kultur stok. Kultur stok hanya digunakan 1 kali pada setiap uji.

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

1.6.2.5. Pembuatan Standar Turbiditas Inokulum

Pembuatan standar turbiditas inokulum digunakan sebagai parameter pengukuran nilai kekeruhan bakteri yang setara dengan 10^8 CFU. Nilai densitas standar inokulum ekuivalen dengan 0,5 standar *McFarland*. Pembuatan larutan standar *McFarland* menggunakan BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1%. Larutan BaCl_2 1% sebanyak 0,5 ml ditambahkan ke dalam larutan H_2SO_4 1% 99,5 ml dan campuran larutan dihomogenkan. Densitas yang akan digunakan sebagai standar turbiditas dihitung dengan menggunakan spektrofotometer. Absorbansi dihitung menggunakan panjang gelombang 600 nm sehingga menghasilkan standar 0,5 *McFarland*. Setelah nilai absorbansi sesuai, larutan disimpan di dalam tabung vial dan ditutup rapat. Simpan di dalam lemari es 4°C . larutan standar harus dikocok menggunakan *vortex* sebelum digunakan. Apabila terdapat partikel besar larutan harus diganti (NCCLS, 2003).

1.6.2.6. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri

Pembuatan kurva tumbuh bakteri dilakukan untuk melihat fase-fase pertumbuhan pada bakteri berdasarkan nilai absorbansi. Pembuatan kurva tumbuh bakteri dilakukan dengan cara 1 ose bakteri *P. aeruginosa*, *S. typhi*, dan *S. aureus* dimasukan kedalam masing-masing tabung vial yang berisi larutan NB (*Nutrient Broth*) 10 ml. Isolat dihomogenkan menggunakan *vortex*. Inkubasi masing-masing isolat bakteri kedalam *waterbath shaker* dengan kecepatan 90 rpm selama 24 jam. Setelah 24 jam, masing-masing isolat bakteri dilakukan subkultur dengan memasukan 10 ml kedalam tabung *Erlenmeyer* yang berisi larutan NB 90 ml, homogenkan. Inkubasi masing-masing isolat bakteri kedalam *waterbath shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Masing-masing isolat bakteri diukur nilai

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

absorbansinya dari jam ke-0 sampai jam ke-24 dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi dicatat, dibuatkan kurva tumbuh bakteri, dan dianalisis fase tumbuh pada masing-masing bakteri (Cappuccino & Sherman, 2002).

1.6.2.7. Pembuatan Kurva Baku Bakteri

Pembuatan kurva baku bakteri dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan bakteri. Tahap awal pembuatan kurva baku bakteri dilakukan sama dengan pembuatan kurva tumbuh bakteri. Saat bakteri telah mencapai awal, tengah dan akhir fase log (telah diketahui dari kurva tumbuh) masing-masing bakteri, dilakukan pengenceran inokulum bakteri dengan cara 1 ml inokulum bakteri pada jam fase log awal, tengah dan akhir diambil dan dimasukkan kedalam tabung reaksi 1 yang berisi 9 ml NaCl 0,85% lalu di *vortex* dan dihasilkan suspensi pengenceran 10^{-1} , diambil kembali sebanyak 1 ml dari tabung reaksi 1 lalu masukan kedalam tabung reaksi 2 yang berisi 9 ml NaCl 0,85% lalu di *vortex* dan dihasilkan suspensi pengenceran 10^{-2} . Lakukan hal yang sama hingga dihasilkan suspensi pengenceran 10^{-8} . Suspensi pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dari setiap fase log awal, tengah dan akhir masing-masing bakteri dimasukkan sebanyak 1 ml ke dalam cawan Petri steril. Setelah itu dimasukkan NA (*Nutrient Agar*) yang masih cair dan hangat ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) sebanyak 9 ml kedalam cawan Petri yang berisi suspensi bakteri. Lalu homogenkan. Inkubasi pada suhu 37°C dalam posisi cawan Petri terbalik selama 24 jam. Setelah 24 jam hitung jumlah koloni pada cawan Petri dan data dianalisis sehingga didapatkan hasil suspensi bakteri yang ideal untuk pengujian antibakteri (Cappuccino & Sherman, 2002).

1.6.2.8. Persiapan Inokulum

Membuat standar inokulum bakteri dilakukan dengan cara inokulum bakteri yang telah ditumbuhkan hingga mencapai fase log ditambahkan ke dalam

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

larutan fisiologis (NaCl 0,85%) sampai nilai turbiditasnya sesuai dengan 0,5 standar *McFarland* (Mulu, dkk. 2004).

1.6.3. Tahap Perlakuan

1.6.3.1. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kulit Akar *Avicennia alba* dan *Rhizophora apiculata*

Larutan stok (50%) ekstrak yang telah dibuat pada tahap pelaksanaan dibuatkan konsentrasi yang telah ditentukan yaitu berdasarkan uji pendahuluan (lampiran 4). Berdasarkan uji pendahuluan maka dapat dibuatkan konsentrasi ekstrak untuk uji antibakteri yaitu 2%, 4%, 8%, 16% 20% pada masing-masing ekstrak dengan cara diencerkan dengan pelarut DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) 100% untuk *A. alba* dan DMSO 10% *R. apiculata*. Kemudian masing-masing konsentrasi di *vortex*.

1.6.3.2. Uji Antibakteri

Uji Antibakteri dengan metode *disc-diffusium* Kirby Bauer dengan teknik *Spread plate*. Medium *Nutrient Agar* (NA) steril dipanaskan di *hot plate* suhu 150°C hingga mencair. Sebanyak 9 ml NA ditempatkan ke dalam cawan Petri. Setelah NA pada cawan Petri padat, masing- masing bakteri yang telah disesuaikan dengan 0,5 standar *McFarland* dipipetkan sebanyak 200 µl lalu dimasukkan ke dalam cawan Petri dan diratakan dengan batang bengkok steril. Kertas cakram dengan diameter 5 mm yang telah disterilkan direndam selama 10 menit pada setiap konsentrasi ekstrak (2%, 4%, 8%, 16%, dan 20%), tetracyclin 0,01% digunakan sebagai kontrol positif sedangkan DMSO 100% dan DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif. Cakram yang telah direndam diambil menggunakan pinset steril lalu diletakkan dipermukaan NA yang telah terdapat inokulum bakteri. Satu kali pengulangan uji antimikroba terdiri dari 2 cawan Petri, cawan Petri yang terdiri dari 4 konsentrasi ekstrak (2%, 4%, 8% dan 16%) dan cawan

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Petri yang terdiri dari konsentrasi ekstrak 20%, kontrol positif dan kontrol negatif. Setelah cakram diletakkan, pada masing-masing bagian perlakuan diberi keterangan konsentrasi yang digunakan, jenis ekstrak, dan jenis bakteri. Kemudian pada tepi cawan Petri dilapisi oleh plastik wrap agar tidak terkontaminasi. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi cawan Petri dibalikkan. Setelah 24 jam diukur zona hambat berdasarkan diameter area zona bening di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong (Cappuccino & Sherman, 2002).

1.6.3.3. Uji Statistika

Data yang diperoleh dari uji antibakteri yaitu diameter zona hambat dari masing-masing ekstrak

dianalisis secara deskriptif dengan menampilkan tabel dan gambar. Data hasil uji antimikroba dianalisis menggunakan program SPSS versi 16 *for window* dengan tingkat akurasi 95%. Jenis analisis data yang dilakukan diantaranya:

1. Uji Normalitas

Uji Normalitas dilakukan pada masing-masing kelompok perlakuan terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *S. typhi*, dan *S. aureus*. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Uji normalitas dilakukan sebagai uji asumsi dasar dalam uji statistika untuk mengetahui sebaran data. Jika hasil signifikansi uji Normalitas $\alpha \geq 0,05$ maka data terdistribusi normal, sedangkan jika signifikansi $\alpha \leq 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal. Hasil analisis data menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal sehingga dilakukannya uji non parametrik Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney.

2. Uji Kruskal-Wallis

Uji Kruskal-Wallis dilakukan pada masing-masing kelompok perlakuan terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *S. typhi*, dan *S. aureus*. Uji Kruskal-Wallis dilakukan untuk menentukan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan pada variabel independent (jenis mangrove, konsentrasi dan bakteri) pada variabel dependent (diameter zona hambat) dengan cara membandingkan nilai tengah (median) sampel dengan data ordinal. Jika hasil signifikansi uji Kruskal-Wallis menunjukkan $\alpha \geq 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Jika hasil signifikansi uji Kruskal-Wallis menunjukkan $\alpha \leq 0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan pada variabel independent tersebut terhadap variabel dependent.

Amanda Adistya, 2018

PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN *Rhizophora apiculata* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN IKAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

3. Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney merupakan uji non parametrik tes yang dilakukan apabila data tidak terdistribusi normal. Uji Mann-Whitney dilakukan untuk mengetahui perbedaan median 2 kelompok pada masing-masing kelompok perlakuan terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *S. typhi*, dan *S. aureus*. Jika hasil signifikansi uji Mann-Whitney menunjukkan $\alpha \geq 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada 2 kelompok tersebut terhadap variabel dependent (diameter zona hambat). Jika hasil signifikansi uji Mann-Whitney menunjukkan $\alpha \leq 0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan pada 2 kelompok tersebut terhadap variabel dependent.

Amanda Adistya, 2018

**PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN
Rhizophora apiculata TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN
IKAN**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Amanda Adisty, 2018

***PENGARUH EKSTRAK KULIT AKAR MANGROVE *Avicennia alba* DAN
Rhizophora apiculata TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN
IKAN***

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu