

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode kuantitatif sebab gejala yang diamati dapat diubah menjadi angka-angka kemudian dianalisis dengan menentukan data statistik. Penelitian kuantitatif merupakan penelitian yang mewajibkan peneliti dalam menguraikan keterlibatan variabel yang dipengaruhi variabel lainnya (Creswell, 2012). Jenis penelitian merupakan penelitian eksperimental. Penelitian yang dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen yang bertujuan untuk menyelidiki pengaruh satu variabel terhadap variabel lainnya pada kondisi yang dikontrol secara ketat (Sugiyono, 2011).

Pandangan yang sama adalah penggunaan desain eksperimen dalam menentukan kemungkinan hubungan sebab akibat antara variabel independen dan variabel dependen, artinya diusahakan dapat mengontrol semua variabel yang akan mempengaruhi hasil, kecuali variabel independen. Desain penelitian yang dipakai adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) yaitu 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, serta pembanding yaitu *aquades* (kontrol negatif) dan *rifampisin* (kontrol positif) yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk uji aktivitas antibakteri dan uji toksisitas, namun pada uji fitokimia tidak dilakukan pengulangan.

3.2. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini bertujuan untuk menguji zona hambat ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang akan dilakukan di Laboratorium Sumberdaya Kelautan dan Perikanan Universitas Pendidikan Indonesia Kampus Serang. Waktu penelitian ini akan dilaksanakan pada Januari 2022 – Maret 2022.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit pisang kepok didapatkan dari daerah Kota Cilegon, Banten dan pengusaha keripik pisang di daerah Kota Cilegon.

3.3.2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian yaitu ekstrak kulit pisang kepok didapatkan dari pasar Kranggot Kota Cilegon, Banten dan pengusaha keripik pisang Daerah Cilegon. Bakteri *Aeromonas hydrophila* didapatkan dari Laboratorium Kesehatan Ikan BPP – IPB University dan *Artemia salina* didapatkan dari penjual ikan di Daerah Cilegon.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Dasarnya prinsip dalam meneliti yaitu dengan dilakukan penilaian pada keadaan alam dan sosial, sebab penelitian ini menggunakan prinsip dalam penilaian, maka menggunakan penilaian yang baik salah satunya yaitu menggunakan peralatan ukur yang tepat. Oleh karena itu, peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya, cawan petri, wadah bak, timbangan digital, jangka sorong, tabung reaksi, bunsen, jangka sorong, pembolong kertas, pipet tetes, pipet ukur, *vacuum rotary evaporator*, inkubator, bejana maserasi, thermometer, spatula, jarum ose, rak tabung reaksi, gelas ukur, gelas kimia, autoklaf, labu *erlenmeyer*, corong, botol kaca, *aerator*, mortar, handphone dan alat tulis.

3.4.2. Bahan

Bahan penelitian ini adalah kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) yang didapatkan dari pedagang pisang yang ada di daerah Kota Cilegon Provinsi Banten, bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Artemia salina*, kertas cakram, kertas label, aluminium foil, TSB (*Trypticase Soy Broth*), *aquades*, tissue, karet, NaCl, HCl, etanol 96%, pereaksi Dragendorff, FeCl₃, HCl 2N, CHCl₃, dan pereaksi Liebermann Burchard.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Persiapan Bahan

Limbah kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) sebanyak \pm 6 kg yang didapatkan dari penjual keripik pisang di daerah Cilegon, Banten dilakukan sortasi untuk memisahkan pada kulit pisang yang masih memiliki warna hijau mentah dengan kulit pisang yang berwarna kuning dan bonggol pisang kepok (*Musa balbisiana*). Limbah kulit pisang yang sudah dipisahkan, lalu dilakukan pencucian menggunakan air mengalir sehingga kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) bersih dari kotoran pada bagian luar kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*). Limbah kulit pisang kepok yang sudah bersih dilakukan pemotongan kecil-kecil agar dapat memudahkan pada proses pengeringan.

Proses pengeringan limbah kulit pisang kepok dilakukan selama 2-3 dengan menggunakan sinar matahari, pengeringannya dibantu dengan paranet agar sinar matahari tidak langsung terkena ke kulit pisang kepok dan kandungan senyawa aktif pada kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) tidak rusak. Sampel dijadikan dalam bentuk potongan kecil agar kandungan senyawa aktif yang ada pada sampel tidak rusak diakibatkan dengan panas yang berlebih jika ingin dilakukan dalam bentuk yang lebih kecil lagi. Hasil pengeringan dapat digunakan untuk lakukan metode maserasi.

3.5.2. Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang Kepok

Pembuatan ekstrak kulit pisang kepok dengan metode maserasi. Metode maserasi ini digunakan karena metode ekstraksi sederhana dan dapat menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung bahan aktif, serta mekanisme pengerjaan dan peralatan yang digunakan juga sederhana serta mudah diperoleh pada laboratorium (Ningsih *et al.*, 2016).

Hasil pengeringan dari kulit pisang kepok tersebut disimpan didalam wadah yang kedap udara untuk menghambat pertumbuhan jamur. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara mencampurkan hasil pengeringan kulit pisang kepok dengan etanol 96% dengan

perbandingan 1:6 yaitu 100gr kulit pisang kepok dengan 600 mL etanol 96%. Maserasi dilakukan hingga senyawa tercampur semua selama 2-3 hari dengan ditutup menggunakan alumunium foil agar terlindung dari cahaya matahari langsung serta dilakukan beberapa kali pengadukan. Proses maserasi dilakukan dengan 1 kali tahapan penyaringan yaitu penyaringan menggunakan kertas saring sehingga diperoleh hasil sampel yang ditampung dalam wadah yang tertutup dan terhindar dari cahaya matahari langsung. Proses maserasi dilakukan sampai diperoleh hasil maserasi berwarna jernih atau mendekati jernih (Saraswati, 2015). Proses maserasi dilakukan sebanyak 15 kali sampai menghasilkan larutan yang cukup untuk dilakukan *evaporasi*.

Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%, karena etanol 96% memiliki tingkat keamanan dan kemudahan saat lakukan penguapan serta memiliki sifat yang mampu melarutkan zat baik bersifat polar maupun non polar (Sulastri *et al.*, 2015). Etanol 96% sangat efektif dalam dapat menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dengan hanya sejumlah kecil zat pengganggu yang masuk kedalam ekstrak (Voight, 1994). Hasil maserasi yang sudah jernih lalu dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 45°C sehingga dapat diperoleh ekstrak kulit pisang kepok yang kental dengan pelarut etanol 96% (Noorhamdani *et al.*, 2012).

3.5.3. Pengujian Fitokimia

Pengujian fitokimia ini dilakukan dengan beberapa uji diantaranya uji flavonoid, uji alkaloid, uji tanin, uji saponin, uji triterpenoid dan uji kuinon.

a. Uji Flavonoid

Ekstrak kulit pisang diambil sebanyak 0,5 gram lalu dimasukkan kedalam wadah kemudian ditambahkan etanol 96% dan 5-6 tetes HCl pekat. Sampel dikocok dan diamati sampai terjadi perubahan warna jika terbentuk warna merah, jingga atau kuning menunjukkan bahwa adanya flavonoid pada larutan tersebut (Tiwari *et al.*, 2011).

b. Uji Alkaloid

Ekstrak kulit pisang diambil 0,5 gram lalu dimasukkan kedalam wadah, larutkan kedalam HCL, kemudian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Dragendorff (larutan *Potassium bismuth iodide*) ditunggu sampai terdapat endapan berwarna merah yang dapat menandakan positif adanya alkaloid, namun jika ditambahkan pereaksi Mayer (larutan *Potassium merkuri iodide*) sebanyak 2-3 tetes terdapat endapan kuning maka ekstrak tersebut mengandung senyawa alkaloid (Tiwari *et al.*, 2011)

c. Uji Tanin

Ekstrak pisang kepok diambil sebanyak 0,5 gram lalu tambahkan 3 mL air hangat. Ekstrak kemudian teteskan $FeCl_3$ 1% sebanyak 1-2 tetes sampel diamati sampai terjadi perubahan warna jika terbentuk warna biru tua atau kehitaman sehingga dapat dikatakan larutan tersebut terdapat senyawa golongan tanin (Markham, 1988)

d. Uji Saponin

Ekstrak kulit pisang diambil sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 mL *aquades* sampai ekstrak kulit pisang terendam semua kemudian dikocok dengan kuat. Sampel didiamkan selama 10 menit lalu diamati, jika terbentuk busa setelah dilakukan pengocokan maka tunggu sampai busa stabil selama 10 menit. Hal ini dapat dikatakan bahwa ekstrak kulit pisang kepok mengandung senyawa saponin (Harborne, 2006)

e. Uji Triterpenoid

Ekstrak kulit pisang kepok diambil sebanyak 0,5 gram lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan $CHCl_3$ sebanyak 2 tetes dan 3 tetes pereaksi Lieberman Burchard (campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Terbentuk warna merah pertama kali dan berubah warna menjadi warna merah saat diamati maka hal tersebut dapat dikatakan positif adanya senyawa triterpenoid (Ngajow *et al.*, 2013)

f. Uji Kuinon

Ekstrak kulit pisang kepok diambil sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan kedalam wadah, lalu diteteskan 1-2 larutan NaOH 1 N sehingga akan terbentuk warna merah yang menandakan bahwa terdapat senyawa golongan kuinon (Markham, 1988).

3.5.4. Pembuatan Media dan Bakteri

Pembuatan media agar menggunakan media TSB (*Trypticase Soy Broth*) dengan memasukkan 15 g TSB dan 10 g NaCl yang dilarutkan kedalam 500 ml *aquades* yang ditempatkan dalam labu *erlenmeyer*. Kemudian labu *erlenmeyer* tersebut ditutup dengan aluminium foil dan diautoklaf menggunakan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Fandina, 2012). Media yang telah disterilkan diletakkan pada suhu ruangan hingga dingin. Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan media TSB ini didapatkan dari Laboratorium Kesehatan Ikan BPP, IPB University. Bakteri *Aeromonas hydrophila* yang telah dilakukan pengenceran sebanyak 10^8 CFU/mL. Pengenceran pada bakteri dilakukan agar mendapatkan pertumbuhan kerapatan pada koloni yang tepat (koloni tumbuh tidak terlalu padat dan tidak terlalu sedikit). Media TSB didapat sebanyak 15 buah cawan petri.

3.5.5. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan menggunakan metode Difusi Kertas Cakram (Jawetz *et al.*, 2005). Uji aktivitas antibakteri ini menggunakan 5 perlakuan yaitu ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, kontrol negatif menggunakan *aquades*, dan kontrol positif menggunakan antibiotik (*rifampisin*). Pengukuran hasil uji antibakteri dapat dilakukan dengan menggunakan Diameter Daerah Hambat (DDH) untuk melihat perkembangan bakteri yang terdapat di sekitar kertas cakram diukur dengan jangka sorong dan proses inkubasi dilakukan dengan suhu 37°C selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Metode pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan *spread*

plate. Sebanyak 100 μ L suspensi bakteri diambil menggunakan mikropipet kemudian dituangkan ke media agar TSB yang berada di cawan petri lalu diratakan dengan menggunakan jarum ose sampai mengering. Cawan petri yang berisi bakteri, kemudian diletakkan beberapa kertas cakram pada masing – masing konsentrasi berbeda yaitu 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, kontrol negatif (*aquades*) dan kontrol positif (*rifampisin*).

3.5.6. Pengujian Toksisitas

3.5.6.1. Persiapan Larva *Artemia salina*

Telur udang ditetaskan selama 2 hari sebelum dilakukan pengujian. Penetasan *Artemia salina* dilakukan di bejana dengan cara merendam sebanyak 2,5 mg telur dalam wadah yang diisi air sebanyak 200 mL yang dilakukan dalam suhu ruangan serta dilengkapi dengan *aerator* (Rampe & Tombuku, 2016). Telur larva *Artemia salina* menetas dan berubah menjadi larva setelah 24 jam. Larva *Artemia salina* yang bagus untuk dilakukan uji BSLT dan siap dilakukan uji toksisitas yaitu berumur 48 jam karena larva *Artemia salina* masih dapat bertahan hidup karena mempunyai cadangan makanan, jika lebih dari 48 jam larva *Artemia salina* akan dikhawatirkan mengalami kematian sebab terbatasnya persediaan makanan. Selain itu, larva *Artemia salina* pada umur 48 jam masih memiliki kepekaan dan organya sudah terbentuk lengkap salah satunya telah terbentuknya mulut. Terbentuknya mulut ini larva *Artemia salina* akan bisa meminum air laut serta ekstrak kulit pisang kepok yang akan dilakukan pengujian. Mekanisme kerja larva *Artemia salina* dipisahkan dari telurnya dapat dilakukan menggunakan pipet dan dimasukkan ke dalam tabung kimia yang sudah diisi air laut (Hayati & Halimah, 2010).

3.5.6.2. Pembuatan Konsentrasi Sampel Uji

Konsentrasi larutan uji dengan metode BSLT yaitu 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, kontrol negatif menggunakan *aquades* sebanyak 10 mL, dan kontrol positif menggunakan antibiotik

(rifampisin) sebanyak 10 mL. Pembuatan larutan stok, ekstrak kental kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) ditimbang sebanyak 0,2 gr. konsentrasi yang digunakan yaitu menggunakan konsentrasi dari ekstrak kulit pisang pada aktivitas antibakteri.

3.5.6.3. Pelaksanaan Uji Toksisitas

Uji toksisitas pada setiap ekstrak kulit pisang kepok. Siapkan wadah yang akan digunakan pada pengujian setiap konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok dengan memerlukan 5 wadah dilakukan penelitian dengan 3 perlakuan dan 2 kontrol. Setiap konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor *Artemia salina* dan dilakukan pengamatan selama 24 jam terhadap kematian larva, dimana setiap konsentrasi dilakukan perbandingan dengan kontrol. Kriteria standar dalam menilai kematian larva udang yakni apabila tidak adanya pergerakan selama dilakukan pengamatan. Setelah dilakukan pengamatan selama 24 jam, maka dari itu tingkatan toksisitas dapat ditetapkan dengan menghitung jumlah larva yang mati. Nilai LC_{50} dapat ditentukan berdasarkan Analisis Regresi Linier (Widiyatni,2010) dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1

Tingkat Toksisitas

No.	Nilai LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Tingkat Toksisitas
1.	0-250	Sangat toksik
2.	250-500	Toksik
3.	500-1000	Sedang
4.	>1000	Tidak toksik

3.6. Analisis Data

3.6.1. Teknik Pengumpulan Data

Dalam penelitian ini peneliti melakukan metode eksperimen untuk mendapatkan hasil. Data yang diperoleh dari hasil eksperimen merupakan sumber data primer karena sumber data primer ini dapat langsung memberikan data kepada peneliti. Data yang didapatkan dari

uji aktivitas antibakteri berupa diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi dan uji toksisitas data didapatkan dari persentase kematian larva *Artemia salina* pada setiap konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok serta uji fitokimia data didapat dari *skrining* fitokimia kualitatif.

3.6.2. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis statistik deskriptif dengan melakukan perbandingan berbagai konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan aktivitas bakteri *Aeromonas hydrophila* menggunakan metode *One Way ANOVA* dengan taraf 5% , sebelum dilakukan uji *One Way ANOVA* data yang diperoleh harus dilakukan uji Normalitas untuk melihat data berdistribusi normal, jika data sudah berdistribusi normal maka dapat dilakukan uji homogenitas untuk melihat varian data satu dengan data lain sama atau tidak kemudian dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji Duncan untuk melihat hasil dari penelitian yang dilakukan dalam aktivitas antibakteri. Kandungan senyawa aktif dalam ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) dilakukan uji fitokimia. Uji toksisitas menggunakan analisis data regresi linear untuk menentukan persentase kematian larva *Artemia salina* (LC_{50}) selama 24 jam sehingga dapat menentukan tingkat toksisitas ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*).

3.7. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian merupakan dugaan sementara yang dirumuskan dalam menjawab permasalahan mengenai hubungan antara dua variabel atau lebih. Hipotesis penelitian diantaranya hipotesis nol (H_0) dan hipotesis alternatif (H_a).

a. Hipotesis nol (H_0)

Ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) tidak memiliki pengaruh terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*.

b. Hipotesis alternatif (Ha)

Ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) memiliki pengaruh terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*.

3.8. Kerangka Berpikir

Berdasarkan penjelasan yang telah diuraikan berikut adalah kerangka berfikir yang dilakukan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2

Kerangka Berpikir dalam Penelitian

