

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga latoh lengkap dengan akar yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Takalar, Sulawesi Selatan.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga latoh yang masih segar berwarna hijau, tidak layu dan tidak pecah serta terbebas dari hama. Pengambilan latoh di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Takalar, Sulawesi Selatan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari latoh.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari latoh yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang bisa diubah-ubah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel yang diteliti. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dengan berbagai variasi konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari latoh.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel

tergantung dalam penelitian ini adalah variabel yang diukur untuk mengetahui besarnya efek atau pengaruh terhadap variabel lain.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suatu kemurniaan bakteri uji *Escherichia coli*, kondisi laboratorium (meliputi: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, kondisi peneliti, pemilihan alga dan metode ekstraksi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Escherichia coli* yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari latoh.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, latoh adalah makroalga yang masih segar berwarna hijau, tidak pecah dan busuk serta telah dibersihkan dari pengotor menggunakan air mengalir yang diambil dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Takalar, Sulawesi Selatan.

Kedua, ekstrak latoh adalah hasil ekstraksi latoh segar yang dipotong kecil kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu dipekatkan dengan evaporator.

Ketiga, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak latoh yang ditambah pelarut air kemudian difraksinasikan dengan pelarut *n*-heksan.

Keempat, fraksi etil asetat adalah residu dari fraksi *n*-heksan latoh difraksinasikan dengan pelarut etil asetat.

Kelima, fraksi air adalah residu dari hasil fraksinasi pelarut etil asetat dan air, kemudian dipekatkan.

Keenam, bakteri uji adalah bakteri yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Ketujuh, dalam penelitian ini metode difusi dan dilusi digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Metode difusi dilakukan dengan metode cakram dengan berbagai konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, kontrol positif (+), dan kontrol negatif (-) kemudian dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

Kedelapan, Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi steril dengan berbagai konsentrasi yaitu 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,9375; 0,4687; 0,2343; 0,1171; 0,0585%; kontrol positif (+); kontrol negatif (-).

Kesembilan, zona hambat berupa daerah bening yang menunjukkan aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dan fraksi latoh dari berbagai konsentrasi dengan metode difusi.

Kesepuluh, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah sediaan yang dapat menghambat dengan melihat kekeruhan medium dalam tabung. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri dengan melihat pada goresan cawan petri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah alat maserasi, autoklaf, cawan petri, gelas Erlenmeyer 100 ml, gelas ukur 5 ml, 10 ml dan 50 ml, *Laminary Air Flow* (LAF), lemari pendingin, mikropipet 10-100, Ose bulat, Ose lurus, oven, lampu spiritus, objek *glass*, *rotary evaporator*, tabung reaksi, timbangan analitik, corong pisah, vial, kertas saring, lidi steril, pipet ukur, pipet tetes dan *vortex mixer*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah latoh, etanol 96%, *n*-heksan, etil asetat, aqua destillata, McFarland 0,5, asam sulfat pekat, Mg, asam klorida 2%, asam klorida 2 N, larutan dragendorff, kloroform, kristal violet, lugol, alkohol 70%, safranin, reagen *Erlich A*, *Erlich B*, media (EA, BHI, MHA, SIM, KIA, LIA, dan Citrat) dan DMSO 5%.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi

Tahapan pertama penelitian ini adalah dengan melakukan identifikasi latoh yang bertujuan untuk memastikan ciri makroskopis dengan morfologi latoh yang sesuai dengan literatur. Identifikasi alga dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Latoh diambil dari tambak budidaya latoh di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Takalar, Sulawesi Selatan. Sampel yang digunakan adalah latoh yang berusia 1 bulan, masih segar berwarna hijau, tidak layu dan tidak pecah serta terbebas dari hama.

3. Preparasi latoh

Latoh dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa kotoran, partikel pasir dan debris. Pencucian terakhir menggunakan air suling dan dikeringkan dengan cara dianginkan pada tempat yang teduh, latoh yang bersih kemudian dihaluskan dengan *blender* (Etcherla & Rao 2014; Nagaraj & Osborne 2014).

4. Pembuatan ekstrak

Latoh yang sudah dihaluskan ditimbang 1 kg kemudian dilarutkan dengan etanol 5L di dalam botol selama 72 jam dengan sesekali penggojokan. Kemudian ekstrak disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak yang pekat lalu ekstrak didiamkan dalam lemari pendingin dengan suhu dibawah -20°C. Kemudian dilakukan penetapan persen randemen, diperoleh dengan cara menimbang hasil ekstrak pekat, kemudian hasil ekstrak dibagi dengan berat sebelum diekstraksi, kemudian dikalikan 100% (Etcherla & Rao 2014; Nagaraj & Osborne 2014).

5. Penetapan kadar air ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluен yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Kemudian ditimbang seksama ekstrak sebanyak 2 g dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan toluen yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluen mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling dilanjutkan pemanasan selam 5 menit. Biarkan tabung penerima dingin hingga suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluen dan air memisah sempurna. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian dihitung persentasenya (Saifudin, Rahayu, & Teruna 2011).

6. Uji bebas etanol

Ekstrak diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuknya bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi lato

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam lato. Identifikasi senyawa alkaloid, saponin, dan terpenoid dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

5.1 Identifikasi alkaloid. Ekstrak lato ditimbang sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dalam 100 ml air panas dan dipanaskan selama 15 menit, didinginkan dan disaring filtrat yang diperoleh disebut larutan A. Dimasukkan larutan A sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan 1,5 ml asam klorida 2%, larutan dibagi kedalam 3 tabung reaksi dan dibagi masing-masing sama banyak. Tabung reaksi yang pertama sebagai pembanding, tabung reaksi kedua ditambah 2 tetes reagen dragendorff, reaksi positif jika menunjukkan adanya keruhan atau endapan coklat, tabung reaksi ketiga ditambah 2-4 tetes mayer, reaksi positif jika menunjukkan adanya endapan putih kekuningan (Depkes 1978).

5.2 Identifikasi saponin. Ekstrak lato ditimbang sebanyak 0,5 Gram dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Bila dibandingkan dengan larutan standart reaksi positif akan terbentuk buih seperti sarang lebah setinggi 1 sampai 10 cm dan pada penambahan setetes asam klorida 2 N buih tidak hilang (Depkes 1978).

5.3 Identifikasi terpenoid. Ekstrak lato dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung

tersebut. Bila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol. Bila cincin kecokletan atau violet menunjukkan adanya triterpenoid (Depkes 1978).

8. Fraksinasi Ekstrak Latoh

Fraksinasi *n*-heksan, etil asetat dan air dilakukan pembuatan dengan cara diambil ekstrak yang sudah didapatkan dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian difraksinasikan dengan *n*-heksan. Fraksinasi *n*-heksan ditambah pelarut air kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan dilakukan sebanyak tiga kali. Sari yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, hasil fraksinasi ini disebut fraksi *n*-heksan.

Residu fraksinasi *n*-heksan kemudian ditambah dengan pelarut etil asetat. Fraksinasi etil asetat sebanyak tiga kali. Sari yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, hasil fraksinasi ini disebut fraksi etil asetat.

Residu hasil etil asetat kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan di atas *water bath*, hasil fraksinasi ini disebut fraksi air.

9. Identifikasi bakteri uji

7.1 Isolasi. Suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. diinokulasikan pada media *Endo Agar* (EA) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dikatakan positif jika terbentuk koloni berwarna merah dengan kilap logam (Volk dan Wheller 1988).

7.2 Identifikasi pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk meyakinkan bahwa *Escherichia coli* ATCC 25922 merupakan bakteri Gram negatif ditandai dengan sel bakteri berwarna merah dan berbentuk batang. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulas yang difiksasi lalu ditetesi Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan aquadest mengalir kemudian tetesi mordant (Lugols iodin/Gram B) sebagai penguat warna dan diamkan selama kurang lebih 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, setelah itu preparat dilunturkan dengan alkohol (Gram C) dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir lalu dikeringkan. Larutan safranin

(Gram D) diberikan selama 3 menit, dicuci dengan aquadest mengalir lalu dikeringkan. Minyak imersi diberikan di atas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop perbesaran 10x sampai dengan 100x.

7.3 Identifikasi fisiologi dengan uji biokimia

7.3.1 *Sulfide Indol Motilitas (SIM)*. Biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfide indol dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen *Erlich A* dan *B*. uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hasil tersebut bisa dituliskan dengan tanda (-++) .

7.3.2 *Klinger Iron Agar (KIA)*. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar adanya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif jika lereng berwarna merah ditulis (K), bagian dasar berwarna kuning ditulis (A), terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya media ditulis (G), sulfid positif dengan terbentuknya warna hitam pada media ditulis (S+), hasil positif juga dapat dituliskan A/AS-.

7.3.3 *Lisin Iron Agar (LIA)*. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya lisin deaminase dan dekarboksilase. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna merah ditulis (R). berwara kuning berarti suasannya asam (A), jika berwarna ungu berarti tetap karena bakteri tidak memecah lisin (ditulis K) , terbentuknya warna hitam pada media ditulis S+. Hasil positif juga dapat dituliskan K/KS-.

7.3.4 *Simmons Citrate*. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu

37°C. identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrate sebagai sumber karbon. Hasil positif dapat dituliskan dengan warna hijau (-).

8. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli*

Pengambilan suspensi dilakukan dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 Ose bakteri *Escherichia coli*. Suspensi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian kekeruhannya dibandingkan dengan larutan McFarland 0,5 yaitu setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml bakteri *Escherichia coli* bertujuan agar jumlah bakteri yang digunakan selama penelitian sama dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian dan selanjutnya digunakan untuk identifikasi.

9. Pengujian aktivitas antibakteri

Ekstrak dan fraksi yang sudah didapatkan diujikan secara mikrobiologis dengan bakteri uji *Escherichia coli*. Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi digunakan untuk mengetahui diameter hambat yang terbentuk mengelilingi cakram berupa zona bening yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroorganisme yang diperiksa (Jatwetz dkk 2007) sedangkan metode dilusi digunakan untuk penentuan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimal).

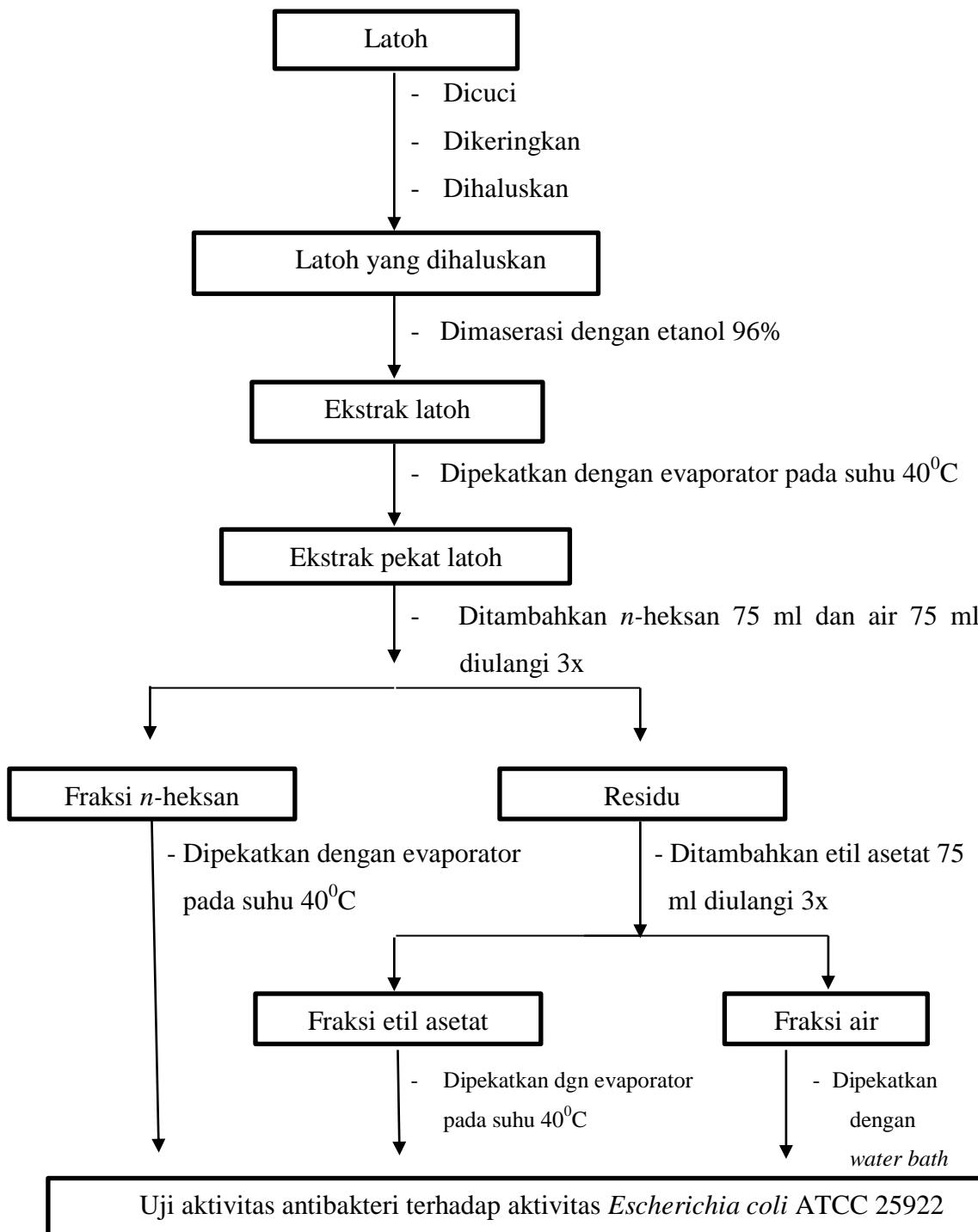
Metode difusi dilakukan dengan mengambil suspensi bakteri menggunakan kapas lidi steril kemudian diratakan pada media MHA dan didiamkan selama 10 menit agar biakan dapat berdifusi ke dalam media pada suhu kamar. Kertas cakram ditetesi larutan uji konsentrasi 10, 20 dan 30% menggunakan pipet mikro lalu didiamkan selama 10 menit dan cakram kontrol positif (+) antibiotik siprofloxacin serta kontrol negatif (-) DMSO 5%. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati aktivitas antibakteri dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat disekitar cakram.

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi steril dengan berbagai konsentrasi larutan stok yaitu 30; 15; 7,5; 3,75% 1,875; 0,9375; 0,4687; 0,2343; 0,1171; 0,056%; kontrol positif (+) suspensi bakteri; kontrol negatif (-) fraksi teraktif. Masukkan 0,5 ml media BHI dari tabung 3 sampai 11, secara aseptik ke dalam tabung 1 dan 2 ditambahkan 1 ml fraksi *n*-heksan 30%. Kemudian dari tabung 2 dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke tabung ketiga, dari tabung ketiga dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke tabung keempat dan begitu seterusnya sampai tabung 11. Pada tabung kesebelas diambil 1 ml kemudian dibuang. Setelah itu dimasukkan suspensi bakteri dalam tabung kedua hingga tabung kesebelas. Dimasukkan kontrol positif berisi 1 ml suspensi bakteri ke dalam tabung 12, diinkubasi semua tabung selama 24 jam suhu 37°C lalu diamati kekeruhannya. Kemudian ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan melihat tabung yang jernih. Kemudian menggoreskan larutan dari sejumlah tabung yang hasilnya jernih pada media MHA, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Boang & Koeswardono 1982).

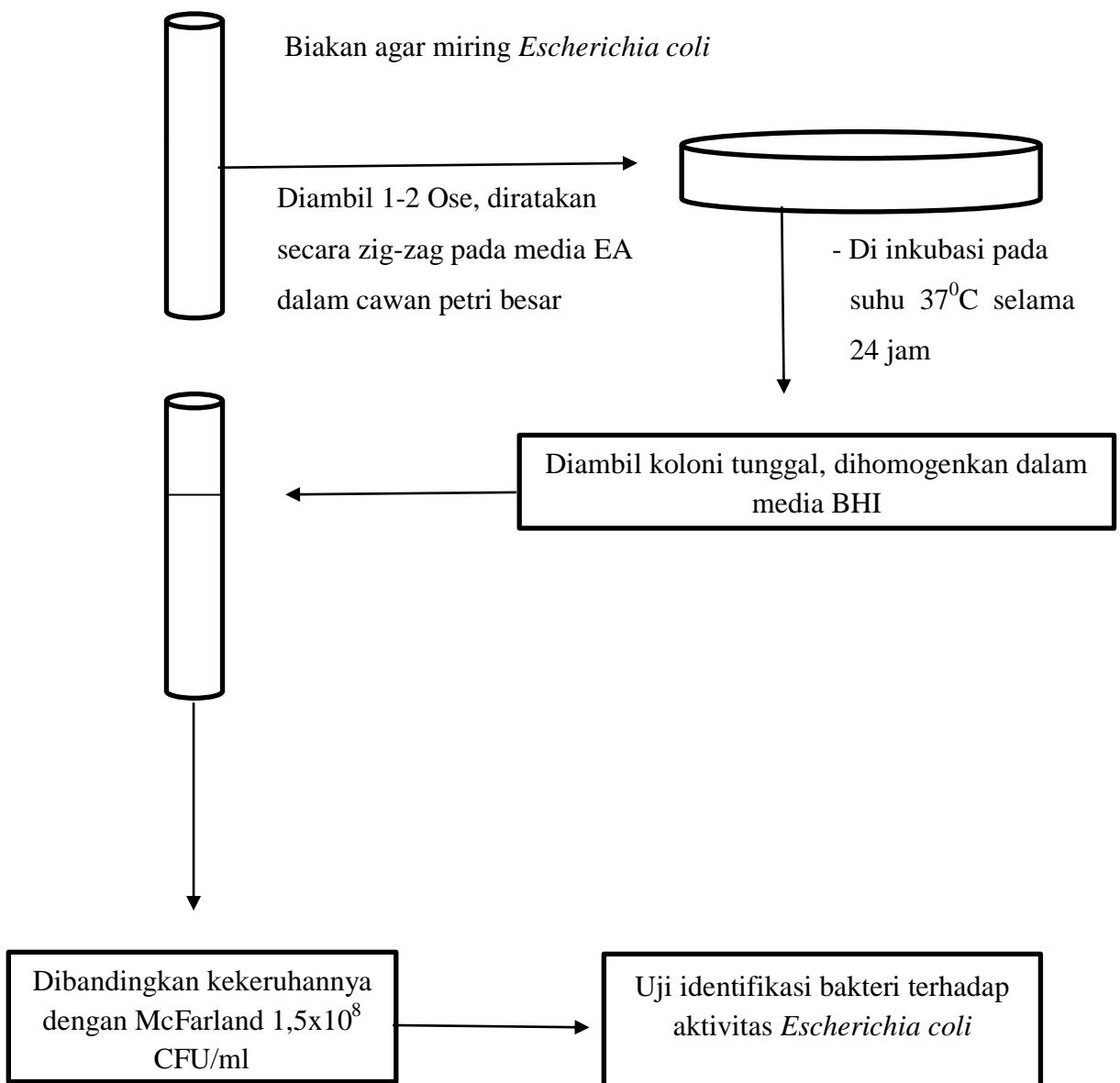
E. Analisis data

Data hasil penelitian efek ekstrak dan hasil fraksi latoh pada *Escherichia coli* dianalisis dengan menggunakan program SPSS 20.0 untuk melihat apakah ada perbedaan efektivitas bermakna dari masing-masing metode uji yang mengandung kontrol positif (+), kontrol negatif (-) serta berbagai konsentrasi ekstrak dan hasil fraksi latoh dalam Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dengan menggunakan Kolmogorov-Smirnov. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,005$) dilanjutkan dengan metode ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Jika distribusi tidak normal maka menggunakan uji nonparametrik yakni uji Kruskall-Wallis. Kemudian untuk membandingkan, menggunakan uji T untuk melihat perbandingan antara metode difusi dan metode dilusi.

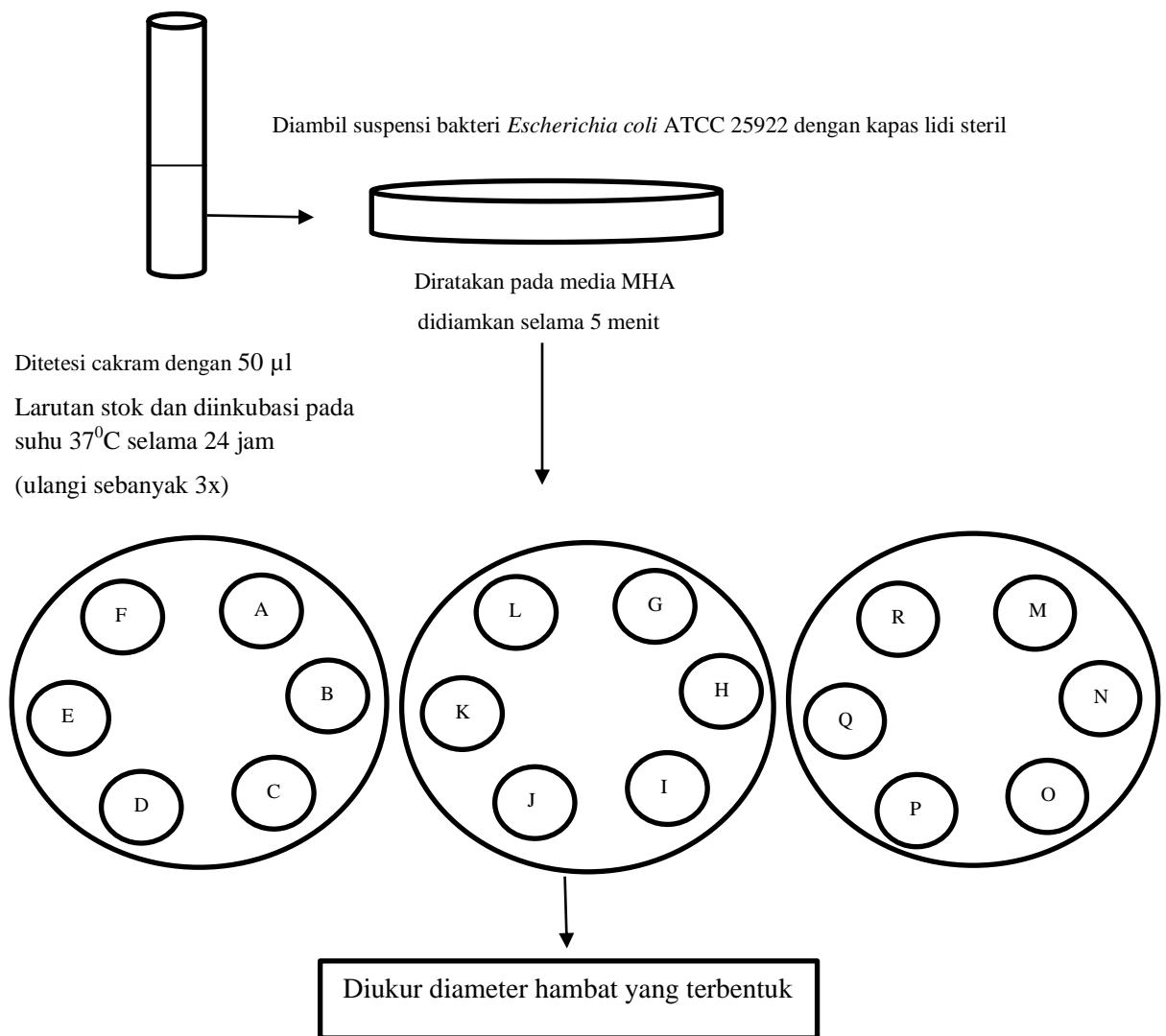
F. Skema Penelitian



Gambar 2. Bagan kerja pembuatan ekstrak dan fraksi latoe (*Caulerpa racemosa*)

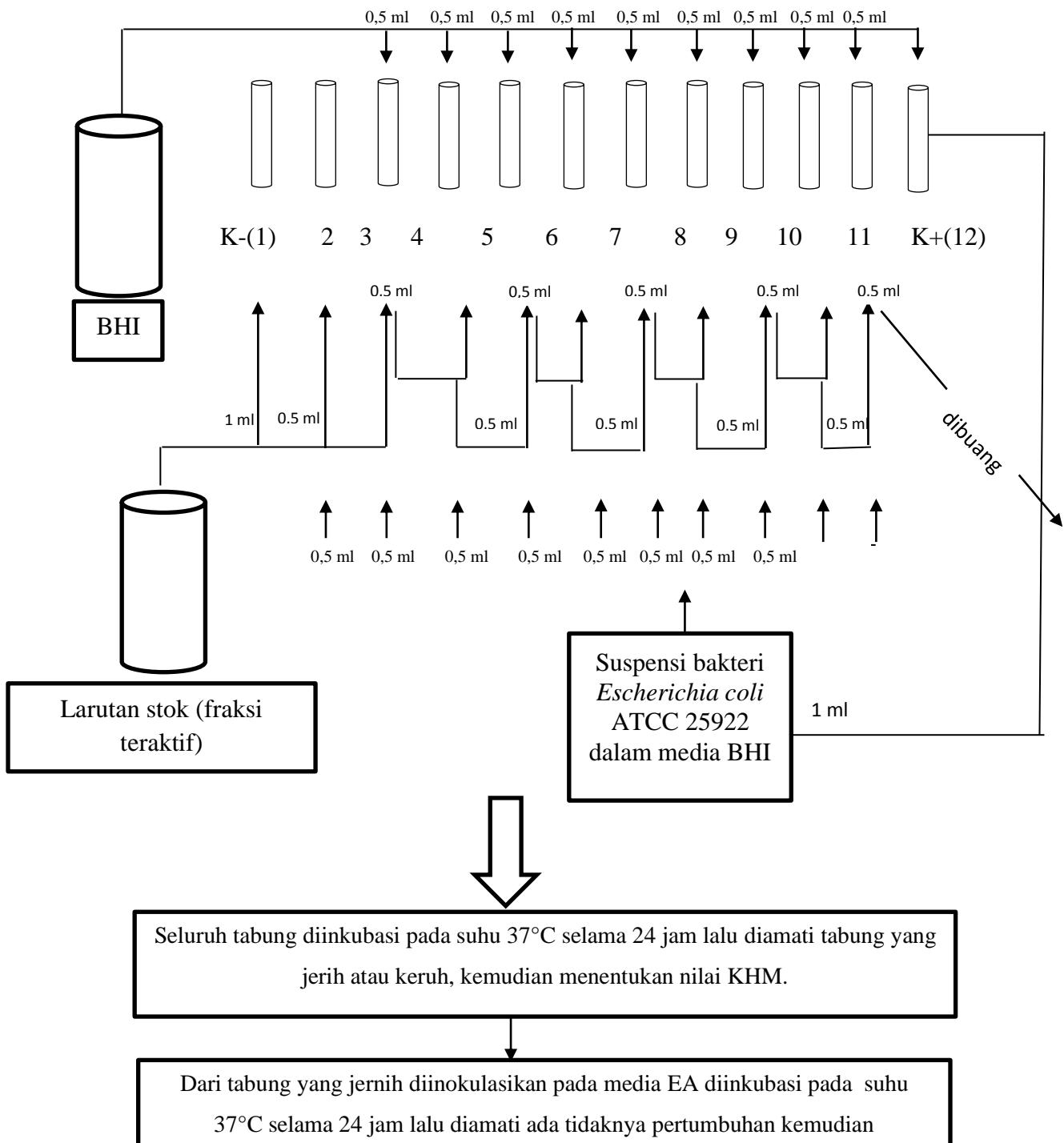


Gambar 3. Pembuatan suspensi antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922



- Ket : - A = ekstrak 10%
 - B = fraksi *n*-heksan 10%
 - C = fraksi etil asetat 10%
 - D = fraksi air 10%
 - E = kontrol - (DMSO 5%)
 - F = kontrol + (Siprofloksasin 5 μ g)
 - G = ekstrak 20%
 - H = fraksi *n*-heksan 20%
 - I = fraksi etil asetat 20%
 - J = fraksi air 20%
 - K = kontrol - (DMSO 5%)
 - L = kontrol + (Siprofloksasin 5 μ g)
 - M = ekstrak 30%
 - N = fraksi *n*-heksan 30%
 - O = fraksi etil asetat 30%
 - P = fraksi air 30%
 - Q = kontrol - (DMSO 5%)

Gambar 4. Skema uji antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi



Gambar 5. Skema uji antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi