

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu

Pelaksanaan kajiannya ini dalam Lab. Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Sidoarjo yang bertempat di kampus I jalan Mojopahit Nomor 666 B. Studi ini dilakukan pada tanggal 6 sampai 27 Mei 2026.

3.2 Materi Kegiatan

3.2.1 Alat

Penggunaan alatnya melalui tissue, label, alat tulis, penutup kaca, alumunium foil, object glass, pinset, black disk, cakram disk, jangka sorong, ose, kapas swab steril, api Bunsen, laminar air flow, vortex, inkubator, pipet steril, micropipette, cawan petri, autoklaf, gelas ukur, serta tabung reaksi.

3.2.2 Bahan

Penggunaan bahan dalam kajian ini ialah: biakan bakteri *Aeromonas hydrophila*, akar bajakah tampala, antibiotik *chloramphenicol* 30µg, alkohol 96%, aquadest, oil emersi, lugol, safranin, krista violet, NaCl fisiologis, media pepton, pelarut DMSO, standart larutan Mc farland 0,5, ekstrak akar bajakah tampala, etanol 96%, *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA), dan media *Muller Hilton Agar* (MHA).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penggunaan metodenya secara eksperimental berkenaan atas ekstrak akar bajakah tampala (*Spatholobus littoralis Hassk*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* terhadap ikan sebagai antibakteri secara in vitro.

3.3.2 Variable Penelitian

1. Variabel bebas

Ekstrak akar bajakah tampala dengan konsentrasi 20%, 30%, 40%, penggunaan kontrol positifnya melalui antibiotik chloramphenicol sementara DMSO untuk kontrol negatifnya.

2. Variabel Terikat

Daya hambat ekstrak akar bajakah tampala kepada *Aeromonas hydrophila* pada instrumen Mueller Hilton Agar (MHA) dengan melakukan pembentukan untuk satuan milimeter (mm).

3. Variabel Kendali

Aeromonas hydrophila dan akar bajakah tampala

3.3.3 Sampel Penelitian

Penggunaan sampelnya ini melalui lima tindakannya yakni kontrol positifnya (K+) melalui chloramphenicol, kontrol negatifnya K- dengan aquadest, P1 melalui ekstrak akar bajakah tampala 20%, P2 dengan bahan yang sama sejumlah 30%, P3 sejumlah 40%.

Berdasarkan penggunaan rumus sampelnya melalui total lima tindakan ialah 25 sampel.

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

Keterangan:

n: total ulangnya

t: total perlakuannya

Jika digunakan rumusnya tersebut, terdapat temuan jumlah samper perlakuannya, yakni:

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

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 = 5$$

3.3.4 Rancangan Penelitian

Penggunaannya melalui tindakan eksperimen melalui acak lengkap (RAL), melalui lima tindakan terhadap lima ulangnya yakni:

1. DMSO sebagai kontrol negatifnya
2. Chloramphenicol sebagai kontrol positifnya
3. Digunakannya ekstrak akar bajakah tampala 20% untuk P1, P2 30%,

dan P3 40%.

Persentase penggunaan ekstrak akar bajakah tampala di kajiannya ini dilaksanakan Azahara dan Khadafi (2023) memiliki hasil yang berpengaruh yaitu pada konsentrasi 20%, 30% dan 40% secara *In vivo*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Akar Bajakah Tampala

Ekstrak etanol dari akar bajakah tampala diperoleh melalui proses maserasi. Sebanyak 1,82 kg serbuk simplisa dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Kemudian, tambahkan 18,2 L etanol 96% (dalam rasio 1:10) atau hingga seluruh serbuk terendam. Simpan di area yang terlindung dari sinar matahari dalam waktu 3 x 24 jam, sembari diaduknya sesekali, yang setelahnya pisahkan maserat dengan penyaringan. Remaserasi dilakukan dengan menambah etanol 96%, yang juga berlangsung dalam waktu 3 x 24 jam. Setelahnya, dilakukan penguapan filtrat melalui *rotary evaporator* di suhu 50°C guna mempercepat proses pemisahan pelarut dari ekstrak yang memiliki khasiat. Ekstrak yang telah setengah menguap kemudian dilakukan penguapannya kembali melalui waterbath di suhu 50°C untuk memastikan masih terdapat sisa pelarut, sehingga menghasilkan ekstrak yang kental berwarna coklat pekat. Ekstrak kental ini dilakukan penyimpanan pada wadah kaca yang ditutup dengan rapat serta dilakukan penyimpanan pada suhu 4°C guna menjaga stabilitas senyawa aktif hingga digunakan pada tahap pengujian selanjutnya.

3.4.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Bajakah Tampala 20%,30%, dan 40%

Variasi konsentrasi ekstrak akar bajakah tampala yang digunakan pada kajian ini terdiri dari kadar 20%, 30%, dan 40%.

1. Pembuatan ekstrak akar bajakah tampala konsentrasi 20% dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,2 ml ekstrak akar bajakah tampala kemudian ditambahkan pelarut DMSO hingga mencapai volume akhir 1 ml.
2. Pembuatan ekstrak akar bajakah tampala konsentrasi 30% dilakukan dengan mencampurkan 0,3 ml ekstrak akar bajakah tampala dengan pelarut DMSO hingga diperoleh volume total sebesar 1 ml.
3. Pembuatan ekstrak akar bajakah tampala konsentrasi 40% dilakukan dengan memasukkan 0,4 ml ekstrak akar bajakah tampala kemudian ditambahkan pelarut DMSO hingga volume akhir mencapai 1 ml.

Tahapan awal dalam pembuatan konsentrasi ekstrak dilakukan dengan menyiapkan tiga buah cawan petri dengan sudah dilabelkan sesuai terhadap tiap-tiap konsentrasi ekstrak. Setiap cawan petri kemudian diberikan perlakuan satu jenis konsentrasi ekstrak akar bajakah tampala, yaitu 20%, 30%, dan 40%.

Selanjutnya, cakram kosong dimasukkan dalam tiap-tiap cawan petri yang telah berisi larutan ekstrak. Cakram tersebut kemudian direndam selama 3 jam agar dapat menyerap ekstrak secara optimal.

Setelah proses perendaman selesai, cakram yang telah mengandung ekstrak diletakkan pada cawan petri steril. Kemudian cakram tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, sehingga dapat digunakan sebagai perlakuan pada media uji.

3.4.3 Pemurnian dan Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

1. Pemurnian Isolat pada Media MCA (*MacConkey Agar*)

Isolat bakteri *Aeromonas hydrophila* diinokulasikan dalam instrument MacConkey Agar (MCA) melalui metode streak plate untuk memperoleh koloni tunggal. Tujuan menggunakan media MCA (*MacConkey Agar*) adalah media ini merupakan media selektif yang menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif berkat kandungan garam empedu dan kristal violet, sementara *Aeromonas hydrophila* sebagai bakteri Gram-negatif dapat tumbuh dengan baik.

Setelah memperoleh koloni tunggal, cawan diinkubasi dalam suhu 35–37°C di waktu 18–24 jam. Penampakan koloni terhadap MCA: 1) Bentuk bulat, halus, tepi rata; 2) Warna pucat/tidak berwarna (*non-lactose fermenter*), jika berubah warna menjadi merah atau pink maka yang tumbuh adalah bakteri *Escherichia coli* atau *Klebsiella sp.*; 3) Permukaan licin dan agak cembung. Koloni tunggal yang terpisah kemudian dipilih untuk proses identifikasi lanjutan.

2. Pewarnaan Gram

Koloni murni diambil menggunakan ose steril dan dibuat sediaan apus pada kaca objek, kemudian difiksasi dan diwarnai pada Gramnya, yakni safranin, alkohol, lugol, kritsal violet, dengan hasilnya yang khas *Aeromonas hydrophila*: 1) Gram-negatif (berwarna merah muda); 2) Bentuk batang pendek (basil); 3) Tidak membentuk spora; 4) Tersusun tunggal atau berpasangan.

3. Uji Biokimia

Koloni murni selanjutnya dilakukan uji biokimia untuk konfirmasi identifikasi.

a. TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*):

Prosedur: Inokulasi dengan metode tusuk dan gores, inkubasi 18–24 jam pada 37°C. Hasil Khas: Biasanya *slant* kuning dan *butt* kuning atau A/A tanpa produksi gas yang menonjol, dan umumnya tidak menghasilkan H₂S yaitu tidak terbentuk endapan berwarna hitam di bagian dasar media, membedakannya secara jelas dari bakteri seperti *Salmonella sp.* atau *Proteus sp.*

b. SIM (*Sulfur, Indole, Motility*):

Prosedur: Inokulasi dengan tusukan lurus, inkubasi 24 jam. Hasil Khas: sulfida negatif dimana media tetap berwarna kuning/pucat asli dan tidak membentuk endapan hitam. Indol positif terbukti dengan terbentuknya cincin berwarna merah ceri (*cherry red*) pada lapisan reagen Kovac's di permukaan media. Motilitas positif dengan

terlihatnya kekeruhan yang menyebar keluar dari bekas jalur tusukan awal. Seluruh media tampak buram atau berkabut, bukan berupa garis lurus yang tajam.

c. SCA (*Simmons Citrate Agar*):

Prosedur: Gores permukaan miring, inkubasi 24–48 jam. Hasil Khas: Sering hasil sitrat positif (+). Bakteri memecah amonium garam di dalam media menjadi amonia yang bersifat basa. Peningkatan pH ini dideteksi oleh indikator *bromthymol blue*, mengubah warna media dari hijau menjadi biru.

d. Urease:

Prosedur: Inokulasi pada media urea, inkubasi 24 jam. Hasil Khas: Umumnya negatif, *Aeromonas hydrophila* tidak memiliki atau tidak memproduksi enzim urease. Karena tidak ada enzim urease, urea di dalam media tidak dihidrolisis, sehingga tidak ada produksi amonia..

e. MR (*Methyl Red*):

Prosedur: Inkubasi pada media MR-VP broth 24–48 jam, tambahkan reagen methyl red. Hasil Khas: Biasanya positif (menunjukkan fermentasi asam campuran). *Aeromonas hydrophila* mampu memfermentasi glukosa di dalam media MR-VP Broth menjadi berbagai senyawa asam campuran (seperti asam laktat, asam asetat, dan asam suksinat).

f. VP (*Voges-Proskauer*):

Prosedur: Pada media yang sama setelah inkubasi, tambahkan reagen VP A dan B. Hasil khas pada uji VP (*Voges-Proskauer*) untuk bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah Positif (+). Hasil positif ini menunjukkan bahwa *Aeromonas hydrophila* memiliki kemampuan untuk memfermentasikan glukosa melalui jalur butanediol dan menghasilkan produk akhir berupa asetoin (asetilmetilkarbinol).

. 4. Pembuatan Suspensi Bakteri Standar McFarland 0,5

Koloni bakteri murni yang telah teridentifikasi diambil menggunakan ose steril serta dilakukan suspensi dalam tabung yang kandungannya 5ml NaCl fisiologis 0,9% steril. Suspensi setelahnya ini dibandingkan terhadap standar McFarland 0,5 secara visual atas latar belakang putih bergaris hitam. Standar McFarland 0,5 sebanding terhadap: $\pm 1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Bila suspensi ini sangat keruh, ditambahkan NaCl steril. Jika terlalu jernih, ditambahkan koloni bakteri hingga kekeruhan sesuai standar. Suspensi yang telah distandarisasi kemudian dipergunakan guna pengujian kegiatan antibakterinya (misalnya metode difusi cakram atau sumuran).

3.4.4 Perendaman Cakram Uji Ekstrak

Kertas cakram steril (blank disc) direndam dalam masing-masing larutan fraksi etanol akar bajakah tampala melalui kadar 20%, 30%, dan 40% (b/v). Perendaman dilaksanakan dalam cawan petri steril yang

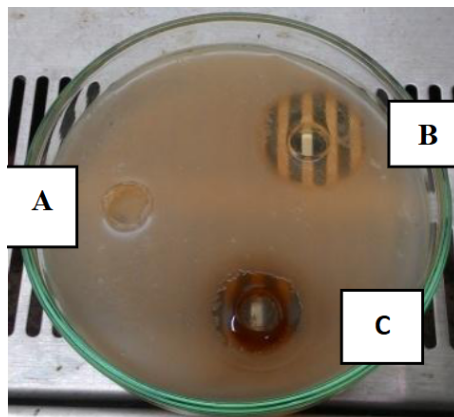
terpisah untuk setiap konsentrasi, sehingga setiap kelompok perlakuan tidak saling terkontaminasi. Cakram dibiarkan terendam selama 1 jam pada suhu ruang agar ekstrak terserap secara optimal ke dalam cakram. Setelah proses perendaman selesai, cakram diangkat melalui pinset sterilnya serta ditempatkan terhadap permukaan medianya agar yang sudah diinokulasikan dengan suspensi bakteri setara standar McFarland 0,5. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu 35–37°C selama 18–24 jam untuk mengamati terbentuknya zona hambat sebagai indikator aktivitas antibakteri (Manek dkk.,2024).

3.4.5 Uji Sensitivitas

Pengujian sensitivitas antibakteri ekstrak akar bajakah tampala terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dilaksanakan melalui metode difusi cakram. Suspensi bakteri yang sudah disesuaikan terhadap standar McFarland sejumlah 0,1 mL dituangkan ke permukaan media MHA, kemudian disebarkan secara merata menggunakan teknik *spread* dan didiamkan selama 10 menit. Setelah suspensi bakteri meresap dan media mengeras, kertas cakram terlebih dahulu direndam ke dalam ekstrak akar bajakah tampala dengan konsentrasi 20%, 30%, dan 40%. Selanjutnya, cakram yang sudah mengandung ekstrak tersebut ditempatkan pada permukaan instrumen MHA. Setiap cawan petri berisi media MHA dipasang tiga buah kertas cakram dengan diameternya 6 mm. Tiap-tiap cawannya ini kemudian diberi penanda sesuai konsentrasi ekstrak yang digunakan, serta kontrol positif dan kontrol negatifnya. Seluruh tindakannya ini dilaksanakan sejumlah lima kali ulangan. Sesudahnya,

dimasukkannya cawan petinya itu dalam inkubatornya dalam waktu 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji sensitivitas antibakterinya ini diobservasi dengan pembentukan zona bening sekitar cakramnya, kemudian diameternya itu dilakukan pengukuran melalui jangka sorong.

3.4.6 Pengamatan Zona Hambat



Gambar 3.1 Pengamatan zona hambat (Paililing *et al.*, 2016)

Keterangan:

- A. Kontrol negatif (DMSO).
- B. Kontrol positif (*Chloramphenicol*)
- C. Cakram disk berisi ekstrak akar bajakah tampala

Pengamatan dilakukan setelah proses inkubasi selama 1×24 jam. Pembentukan area bening di kisaran cakramnya memperlihatkan terdapat suatu respons bakteri kepada antibiotiknya atau penggunaan ekstraknya dalam pengujian. Hasil pengujian dinyatakan berdasarkan besar diameter zona hambat yang diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong. Selanjutnya, tingkat daya antibakteri yang dihambat dikelompokkan sesuai klasifikasi yang dikemukakan oleh Saputera *et al.* (2019). Diameter zona hambatnya ini diukur dengan vertikal dan

horizontal dengan memperhitungkan ukuran kertas cakram, kemudian hasilnya dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

$$\text{Zona Hambat: } \frac{(D1-D3) + (D2-D3)}{2}$$

Keterangan :

D1 = Diameter horizontalnya

D2 = Diameter verticalnya

D3 = Diameter kertas cakramnya (± 6 mm)

3.5 Parameter Penelitian

Kajian ini berparameterkan penentuan dari hasil observasi setelah inkubasi selama 24 jam. Luas zona hambat diperoleh dari area bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram sebagai indikator tingkat kerentanan bakteri kepada penggunaan ekstrak atau antibiotiknya sebagai bahan ujinya. Selanjutnya, persentase diameter penghambatan bakteri untuk tubuh dihitung melalui rumus PIDG (*Percentage Inhibition of Diameter Growth*) sesuai atas metode yang dikemukakan oleh Widhowati et al. (2022).

Rumus PIDG:

$$\text{PIDG} = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Diameter zona cakram bening

B = Ukuran kertas cakram

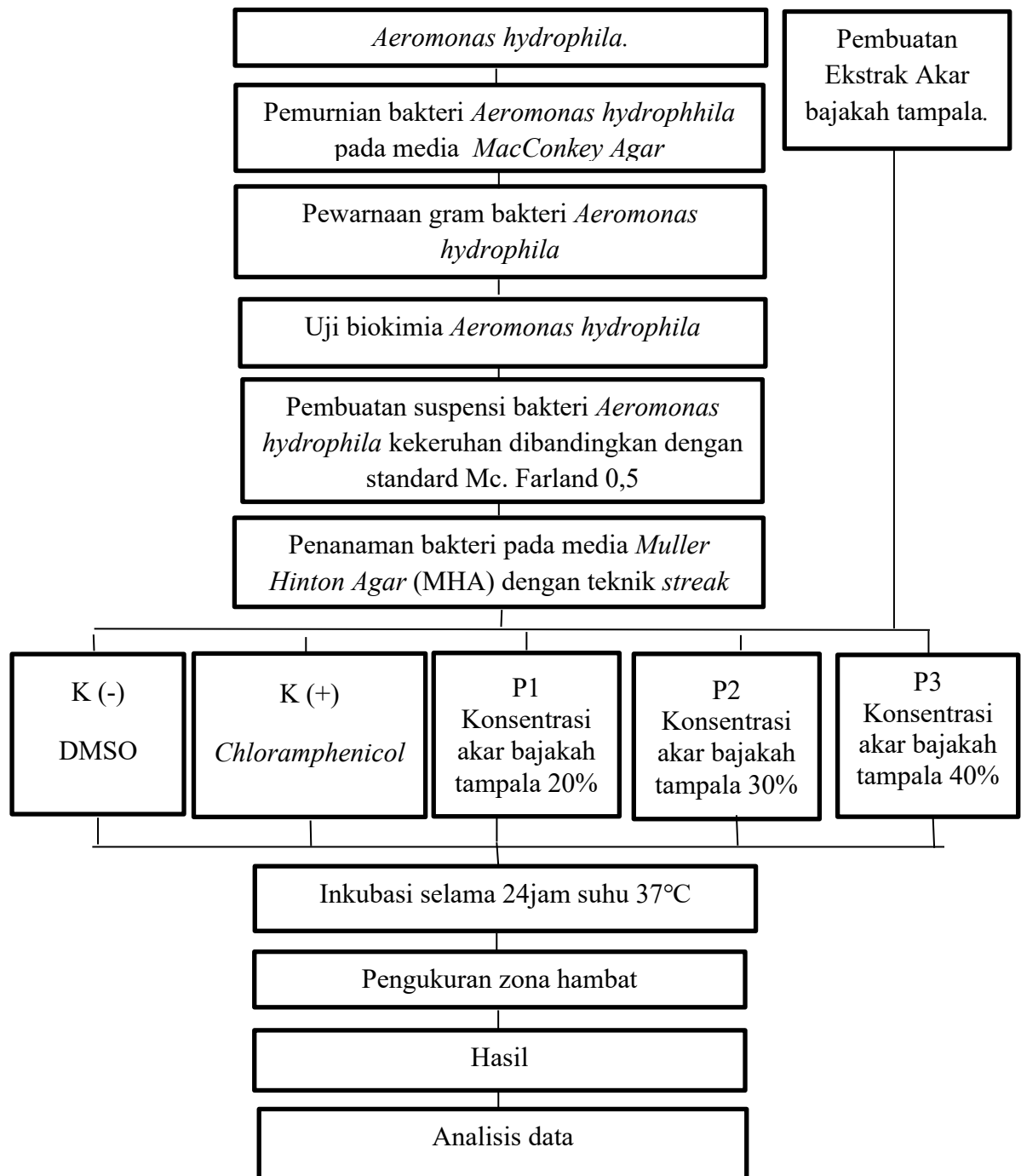
3.6 Analisis Data

Data penelitian dianalisis guna diketahuinya keefektifan ekstrak akar bajakah tampala sebagai antibakteri alami terhadap *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan RAL. Pengolahan data dilakukan melalui uji ANOVA terhadap tingkatan signifikansinya $\alpha = 0,05$. Selanjutnya, bila adanya suatu antarperlakuan yang berbeda dengan signifikan, dilaksanakan pengujian lanjutan Duncan melalui tingkatan signifikansinya yang sama, yaitu $\alpha = 0,05$, untuk menentukan tingkat efektivitas masing-masing perlakuan.

3.7 Kerangka Penelitian

Penggunaan konsentrasi 20%, 30% dan 40% pada perlakuan yaitu: Konsentrasi ekstrak akar bajakah tampala sebesar 20%, 30%, dan 40% (b/v) digunakan sebagai larutan perendaman kertas cakram sebelum ditempatkan pada permukaan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasi dengan *Aeromonas hydrophila*. Penggunaan beberapa konsentrasi bertujuan agar setiap cakram membawa jumlah ekstrak yang berbeda sehingga, setelah diletakkan pada media MHA, senyawa aktif dapat berdifusi secara radial dari cakram ke dalam agar. Selama inkubasi, senyawa antibakteri yang berhasil berdifusi akan menghambat pertumbuhan bakteri di sekitar cakram dan membentuk zona hambat.

Alasan menggunakan *Chloramphenicol* sebagai kontrol positif karena merupakan antibiotik spektrum luas yang efektif terhadap *Aeromonas hydrophila* dan berfungsi sebagai standar pembandingan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak akar bajakah tampala berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk pada media MHA (Elbehiry dkk., 2023).



Gambar 3.2 Kerangka Penelitian