

### 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi penelitian ini meliputi antara lain adalah alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian.

##### 3.1.1 Alat-alat penelitian antara lain:

- Autoklaf
- Lemari pendingin
- Timbangan analitik
- Hotplate
- Vortex
- Blender
- Cawan petri
- Beaker glass
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Pipet volume
- Pipet tetes
- Mikropipet
- Bola hisap
- Bunsen
- Jarum ose
- Triangle
- Spatula
- Pinset
- Sprayer
- Thermometer
- Jangka Sorong
- Botol film
- Rak tabung reaksi
- Corong
- Pisau
- Gunting
- Saringan

### 3.1.2 Bahan-bahan penelitian antara lain :

- Daun binahong (*Anredera cordifolia*)
- Biakan murni *Vibrio harveyi*
- TCBSA (Thiosulfate cytrat bilesalt sukrose agar) Merek OXOID, dosis penggunaan 44 gr/l
- NB (*Nutrient Broth*) merek OXOID, dosis penggunaan 13 gr/l
- Aquades
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Tali
- Kain saring
- Kertas saring
- Kertas alumunium foil
- Kertas label
- Kapas
- Tissue
- Kain lap
- MgSO<sub>4</sub>, KCl dan NaCl

### 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

#### 3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Natzir (1998) penelitian eksperimental adalah

penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab-akibat dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan (Suryabrata, 2006).

Data pada penelitian ini diperoleh dengan cara mengukur garis tengah (diameter) hambatan, yaitu daerah jernih di sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri.

### 3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Rumus dari model RAL (Yitnosumarto, 1991) adalah sebagai berikut :

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Keterangan:

- Y : Nilai pengamatan
- $\mu$  : Nilai rata-rata harapan
- T : Pengaruh perlakuan
- $\varepsilon$  : Galat

Penelitian terdiri dari 6 perlakuan, 3 kali ulangan dan 1 kontrol. Sebagai perlakuan adalah pemberian ekstrak Daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu :

A = Konsentrasi ekstrak daun binahong 3%

B = Konsentrasi ekstrak daun binahong 5%

C = Konsentrasi ekstrak daun binahong 7%

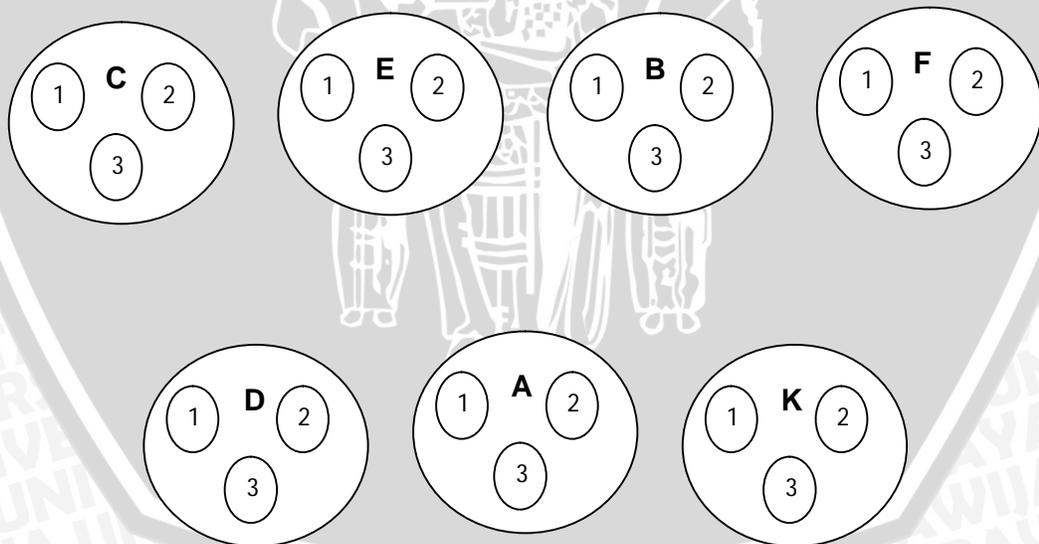
D = Konsentrasi ekstrak daun binahong 9%

E = Konsentrasi ekstrak daun binahong 11%

F = Konsentrasi ekstrak daun binahong 13%

K = Kontrol ( tanpa perlakuan)

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 21. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah percobaan seperti pada Gambar 3 berikut ini:



**Gambar 3. Denah Penelitian**

Keterangan:

A,B,C,D,E,F : Perlakuan

1,2,3 : Ulangan

K : Kontrol

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

- alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan detergen, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen dan diikat menggunakan benang.
- Air secukupnya dituang ke dalam *autoclave*, kemudian alat yang telah dibungkus kertas perkamen dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.
- Kompor pemanas dinyalakan, setelah mencapai suhu 121<sup>0</sup>C dan manometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15-20 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*.
- Kompor dimatikan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup *autoclave* dengan cara simetris.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.3.2 Ekstraksi Daun Binahong (*Anredera cordifolia*)

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara infundasi. Sebagaimana yang tercantum dalam Anonymous<sup>a</sup> (1986). Prosedur ekstrak daun binahong adalah sebagai berikut :

- Daun binahong segar dicuci dengan air tawar sampai bersih kemudian dikeringkan.
- Daun binahong yang telah kering diblender hingga halus.
- Ditimbang sebanyak 30 gr dan dimasukkan ke dalam beakerglas.
- Ditambahkan air suling (aquades) sebanyak 300 ml.
- Dipanaskan di atas pemanas air (hotplate) selama 15 menit terhitung suhu mulai mencapai 90 °C – 98°C sambil sesekali diaduk.
- Kemudian disaring dengan kain saring.
- Ekstrak yang tidak langsung digunakan dapat disimpan di lemari pendingin.

### 3.3.3 Pembuatan Media

#### A. TCBSA (*Thiosulfate Citrat Bilesalt Sukrose Agar*)

- TCBSA sejumlah 8,8 gram, KCl 0,075 gram, MgSO<sub>4</sub> 0,694 gram, NaCl 1,34 gram dilarutkan dalam 100 ml air aquadest steril dalam erlenmeyer steril.
- Dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih dan homogen.
- Larutan tidak disterilkan dalam autoklaf.
- Setelah itu, dalam keadaan panas dituang dalam cawan petri steril.
- Media dibiarkan memadat.

- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin. Cawan petri diletakkan terbalik yaitu bagian tutup berada di bawah untuk menghindari tetesan air kondensasi dalam tutup.

### **B. NB (Nutrient Broth)**

- NB sejumlah 1,3 gram, KCl 0,075 gram, MgSO<sub>4</sub> 0,694 gram, NaCl 1,34 gram dilarutkan dalam 100 ml air aquadest steril dalam erlenmeyer steril.
- Dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih dan homogen.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ± 30°C karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.

### **3.3.4 Inokulasi Bakteri**

#### **A. Media Padat**

- Disiapkan petridisk yang berisi media TCBSA.
- Biakan murni *Vibrio harveyi* diambil sebanyak 1 ose, hasil Laboratorium Mikrobiologi kedokteran (Lampiran 1.)
- Digoreskan ke dalam media TCBSA secara zig-zag.
- Media TCBSA Inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 35 °C selama 24 jam.

## B. Media Cair.

- Disiapkan 5 ml media NB dalam tabung reaksi yang telah disterilkan dengan *autoclave*.
- Sebanyak 5 ose *Vibrio harveyi* dari biakan murni dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media NB tersebut
- Media yang telah mengandung *Vibrio harveyi* ditutup dengan kapas steril dan alumunium foil dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 18-24 jam.
- Hasil biakan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4 °C.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Kerentanan suatu mikroorganisme terhadap zat antibiotik dan zat kemoterapeutik lain dapat ditentukan dengan teknik “pengenceran tabung (*tube dilution*)” atau teknik cawan “piringan kertas (*paper disk plate*)”. Teknik pengenceran tabung menetapkan jumlah terkecil zat kemoterapeutik yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan organisme *in vitro*. Jumlah tersebut sebagai KHM (konsentrasi hambat minimum atau *minimal inhibition concentration*) (Pelczar dan Chan<sup>b</sup>, 1988). Konsentrasi terendah pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM (konsentrasi hambat minimum) dari obat (Anonymous<sup>b</sup>, 2003). Lay (1994) menambahkan MIC (*minimal inhibition concentration*) dapat pula ditentukan dengan penggunaan satu konsentrasi antibiotik dan membandingkannya dengan kecepatan pertumbuhan mikroorganisme dalam tabung kontrol dan tabung yang berisi antibiotik. Penentuan MIC dilakukan sebagai berikut:

- 5 inokulum biakan murni bakteri *Vibrio harveyi* ditanam dalam 5 ml media cair (Nutrient Broth) dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 3 jam sehingga terbentuk kekeruhan yang sama dengan larutan Standart Mc Farland ( $10^8$  sel/ml).
- Membuat stok larutan broth yang diinokulasi bakteri dengan cara mengambil 0,5 ml biakan bakteri dalam Nutrient Broth dan dimasukkan dalam 100 ml NB yang sudah disterilkan. Jumlah suspensi bakteri (stok larutan broth) adalah  $10^6$  sel/ml.
- Penentuan konsentrasi perlakuan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan metode pengenceran. Konsentrasi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Konsentrasi Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) untuk Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)**

Konsentrasi (%)	Larutan stok Ekstrak Daun Binahong ( <i>Anredera cordifolia</i> ) (ml)	Larutan stok broth yang diinokulasi bakteri (ml)
0	0,00	5,00
1	0,05	4,95
2	0,10	4,90
3	0,15	4,85
4	0,20	4,80
5	0,25	4,75
10	0,50	4,50
15	0,75	4,25
20	1,00	4,00
25	1,25	3,75
30	1,50	3,50

- Masing-masing perlakuan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35 °C.
- Diamati pertumbuhan bakteri pada masing-masing perlakuan dengan melihat tingkat kekeruhannya dan dibandingkan dengan kontrol.

Apabila medium tampak keruh menandakan bahwa bakteri dapat tumbuh, hal ini berarti bahwa dosis yang digunakan tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan sebaliknya.

### 3.4.2 Uji Cakram

Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut:

- 5 inokulum biakan murni bakteri *Vibrio harveyi* ditanam dalam 4 ml media cair (Nutrient Broth) dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 3 jam sehingga terbentuk kekeruhan yang sama dengan larutan Standart *Mc Farland* ( $10^8$  sel/ml).
- Disiapkan tabung reaksi steril untuk perlakuan konsentrasi ekstrak daun binahong. Konsentrasi minimum didapatkan berdasarkan hasil uji MIC.
- Penentuan konsentrasi ekstrak daun binahong untuk uji cakram dapat dilihat setelah dilakukan uji MIC.
- Konsentrasi ekstrak daun binahong pada uji cakram dapat dilihat adalah 3%, 5%, 7%, 9%, 11% dan 13%.
- kertas cakram steril direndam ke dalam ekstrak daun binahong selama 30 menit berdasarkan konsentrasi yang telah ditentukan.
- Diambil 0,05 ml bakteri ( $10^6$  sel/ml) dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar dengan ketebalan  $\pm$  6 mm.
- Bakteri diratakan dengan triangle.
- kertas cakram yang telah ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.

- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 24 jam dengan mengukur daerah hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.
- diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong.
- Untuk mengetahui sifat dari setiap konsentrasi yang dilakukan, maka setelah pengukuran diameter zona hambat dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 35 °C. Apabila pada daerah bening terlihat adanya pertumbuhan bakteri, ini berarti dosis tersebut bersifat bakteristatis; tetapi apabila sebaliknya, berarti dosis tersebut bersifat bakteriosidal.

### 3.5 Parameter Uji

#### 3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran daerah hambatan ekstrak daun binahong terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* pada setiap perlakuan yang terlihat di sekitar kertas cakram.

#### 3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media, yang keduanya merupakan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Anonymous<sup>b</sup> (2003) menjelaskan suhu terendah dimana bakteri dapat tumbuh disebut *minimum growth temperature*. Sedangkan, suhu tertinggi dimana bakteri dapat tumbuh dengan baik disebut *maximum growth temperature*. Suhu dimana bakteri dapat tumbuh dengan sempurna di antara

kedua suhu tersebut disebut suhu optimum. Untuk pertumbuhannya, bakteri juga memerlukan pH tertentu, namun pada umumnya bakteri memiliki jarak pH yang sempit sekitar pH 6,5-7,5 atau pada pH netral.

### 3.6 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan, berupa pemberian ekstrak binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap respon parameter yang diukur, berupa luas daerah hambatan, maka dilakukan analisis keragaman atau uji F dan apabila berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji BNT untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95 %). Sedangkan Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi, dilakukan perhitungan analisis regresi yang tujuannya untuk mengetahui sifat dan fungsi regresi yang memberikan keterangan tentang pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon.