

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2023, pelaksanaan determinasi spesies tanaman berenek di *Unit Pelaksana Fungsional Pelayanan Kesehatan Tradisional* Tawangmangu, Jawa Tengah. Pembuatan infusa daun berenek di Laboratorium Farmakologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian efikasi infusa daun berenek terhadap hambatan pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro* dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

#### 3.2 Materi Penelitian

##### 3.2.1 Alat Penelitian

*Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain cawan petri, autoklaf, erlemeyer, gelas ukur, panci infusa, kompor gas, batang pengaduk, gelas ukur, inkubator, saringan 40 mesh, tabung reaksi, mikropipet, rak tabung reaksi, jangka sorong digital, ose, pipet, pinset, api bunsen, oven, stamper, mortar, timbangan digital, dan pisau.*

##### 3.2.2 Bahan Penelitian

*Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain isolat murni *Aeromonas hydrophila*, daun tanaman berenek sebanyak 100 gram, media *Mueller-Hinton Agar* (MHA), aquades steril, media *nutrient agar*, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), *buffer pepton water*, standart larutan Mc. Farland 0,5, cakram disk antibiotik kloramfenikol 30 µg, oil emersi, swap steril, *yellow tips*, *plastic wrap*,*

*swab kapas steril, cakram disk kosong (blank disk), aluminium foil, kain flanel, tissue, gloves, masker, dan alat tulis.*

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Jenis Penelitian**

*Jenis penelitian yang akan dilaksanakan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL).*

#### **3.3.2 Desain Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan lima kali perlakuan dan lima kali pengulangan. Kelompok perlakuan yang akan dilakukan yaitu kelompok kontrol negatif menggunakan DMSO, kelompok kontrol positif menggunakan Kloramfenikol 30 µg, kelompok P1 menggunakan infusa daun berenuk konsentrasi 0,1%, kelompok P2 menggunakan infusa daun berenuk konsentrasi 0,2%, kelompok P3 menggunakan infusa daun berenuk konsentrasi 0,4% (Prakoso *et al.*, 2023).

#### **3.3.3 Variabel Penelitian**

*Penelitian dilakukan dengan menggunakan beberapa variable antara lain variabel bebas yaitu konsentrasi infusa daun berenuk dan konsentrasi antibiotik kloramfenikol, variable kendali yaitu *Aeromonas hydrophila*, dan variable terikat yaitu zona hambat *Aeromonas hydrophila* dan Percentage Inhibition of Diameter Growth (PIDG).*

#### **3.3.4 Teknik Pengambilan Sampel**

*Penelitian ini menggunakan sampel *Aeromonas hydrophila* yang terdapat pada media nutrient agar dan dibiakkan kembali pada media Mueller Hinten Agar*

(MHA). Menggunakan metode difusi kertas cakram (Kirby-bauer) dengan melakukan lima kali perlakuan dan lima kali pengulangan pada masing-masing sampel, sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 15 cawan petri. Pengambilan sampel dilakukan pada akhir periode penelitian dengan mengukur zona hambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Determinasi Tanaman**

Tanaman yang akan digunakan dalam penelitian terlebih dahulu dilakukan determinasi. Determinasi tanaman merupakan proses dalam menentukan spesies tanaman secara spesifik. Determinasi tanaman dilakukan dengan membawa tanaman berenek ke Unit Pelaksana Fungsional Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu, Jawa Tengah.

#### **3.4.2 Sterilisasi Alat**

Peralatan yang digunakan untuk penelitian dibersihkan terlebih dahulu menggunakan sabun antibakteri, dikeringkan, dan ditempatkan pada autoklaf selama kurang lebih 15 menit dengan tekanan 15 Psi dan suhu 121°C (Kurniawansyah., 2016).

#### **3.4.3 Pembuatan Infusa Daun Berenek (*Crescentia cujete L*)**

Daun berenek yang akan digunakan untuk pembuatan ekstrak ditimbang sebanyak 100 gram. Daun berenek dibersihkan dengan menggunakan air mengalir dan ditiriskan hingga kering. Daun berenek diiris tipis dan dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 40°C. Daun berenek yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan mortar dan stamper hingga menjadi serbuk halus dan diayak

dengan menggunakan saringan 40 mesh. Serbuk simplisia daun berenuk ditimbang sebanyak 10 gram kemudian dicampurkan dengan 100 ml aquadest steril (perbandingan 1:10), dipanaskan dalam panci infusa selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C dengan sesekali diaduk. Hasil infusa disaring dengan menggunakan kain flanel (Farmakope Indonesia Edisi III, 1996). Konsentrasi daun berenuk 0,1% sebanyak 10 ml dibuat dengan melarutkan 0,01 ml infusa daun berenuk dengan 9,99 ml DMSO, konsentrasi daun berenuk 0,2% sebanyak 10 ml dibuat dengan melarutkan 0,02 ml infusa daun berenuk dengan 9,98 ml DMSO, konsentrasi daun berenuk 0,4% sebanyak ml dibuat dengan melarutkan 0,04 ml infusa daun berenuk dengan 9,96 ml DMSO (Prakoso *et al.*, 2023).

#### **3.4.4 Peremajaan Bakteri *Aeromonas hydrophila***

*Peremajaan *Aeromonas hydrophila* dilakukan dengan menggunakan media nutrient agar yang sudah dibuat. Secara perlahan ambil koloni bakteri dengan menggunakan ose yang telah disterilkan kemudian digoreskan (streak) pada media nutrient agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rostinawati dkk., 2018).*

#### **3.4.5 Pembuatan Suspensi Bakteri *Aeromonas hydrophila***

*Isolat murni *Aeromonas hydrophila* yang ditumbuhkan pada media nutrient agar akan dibuat menjadi suspensi dalam media cair. Suspensi dibuat dengan mencampurkan koloni *Aeromonas hydrophila* ke dalam tabung reaksi yang berisi buffer pepton water, setelah itu dihomogenkan dengan menggunakan ose steril secara perlahan, tutup dengan kapas steril, dan suspensi diinkubasi pada suhu*

37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi dibandingkan kekeruhannya dengan larutan *Mc Farland 0,5* (Nor dkk., 2018).

#### **3.4.6 Uji Daya Hambat Metode Difusi Kirby-Bauer (Kertas Cakram)**

Pengujian daya hambat dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri pada media MHA dengan menggunakan kapas swab steril yang telah di celupkan pada suspensi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan diratakan secara perlahan, serta didiamkan hingga kering. Tempatkan kertas cakram yang telah direndam selama 15 menit kontrol negatif DMSO, kontrol positif kloramfenikol, dan infusa daun berenuk 0,1%, 0,2%, 0,4% pada permukaan media MHA serta sisakan ruang diantara masing-masing cakram untuk memudahkan pengukuran diameter zona hambat. Media yang sudah diberikan kertas cakram diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, pengujian dilakukan sebanyak lima kali pada setiap kontrol dan konsentrasi. Setelah inkubasi ukur menggunakan jangka sorong zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram (Widhowati dkk., 2022).

#### **3.4.7 Perhitungan Persentase Diameter Zona Hambat Menggunakan Rumus**

##### **PIDG**

Hasil pengukuran zona hambat pada seluruh pengujian diolah dengan menggunakan rumus PIDG sebagai berikut:

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

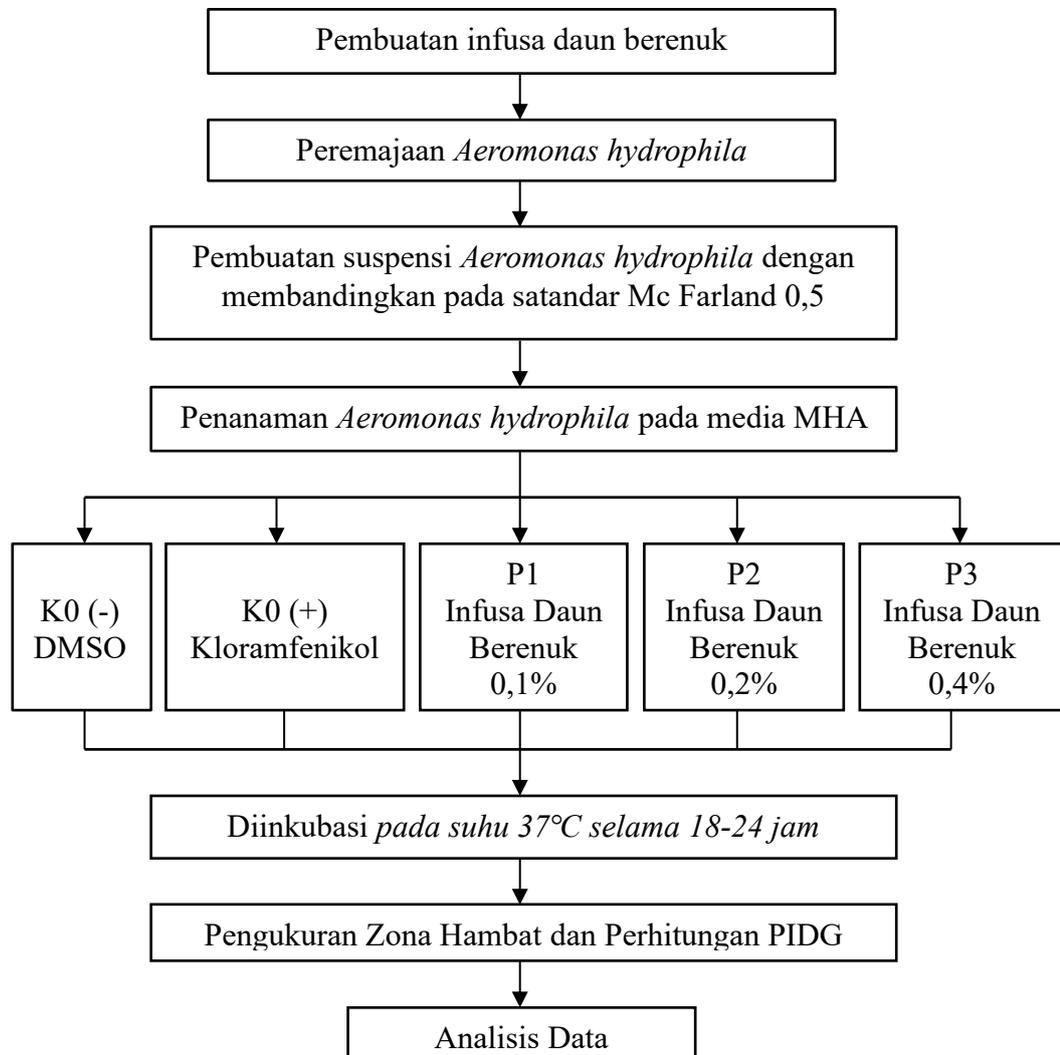
Keterangan:

A = Diameter zona bening

B = Ukuran kertas cakram

**Gambar 3.6** Rumus *Percentage Inhibition of Diameter Growth* (PIDG) (Widhowati dkk., 2022)

### 3.5 Kerangka Penelitian



**Gambar 3.7** Kerangka penelitian

### 3.6 Analisis Data

Data dari hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dikarenakan data tidak berpasangan, jumlah variable lebih dari dua, serta skala variabel penelitian adalah skala numerik. Jika uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p \leq 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan *Bonferroni Post Hoc Test*. Analisis statistik diuji dengan menggunakan server SPSS seri 26.

