

## **BAB 3**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Agustus sampai Desember 2017. Uji *in vitro* akan dilaksanakan di Laboratorium Kampung Vaname Dalegan – Panceng, sedangkan uji *in vivo* akan dilaksanakan di Laboratorium Prodi Budidaya Perikanan, Universitas Muhammadiyah Gresik.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Bahan yang digunakan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : ikan nila (*Oreochromis niloticus*), putih telur bebek, pakan pellet fp 999, isolat bakteri *S. agalactiae* N14G, serbuk daun kayu manis (*C. burmanii*) dengan konsentrasi yang berbeda (0%, 0.25%, 0.5%, 1%), media agar TSA, aquades steril, alkohol 70% dan 96%, spirtus, media cair TSB, PBS.

##### **3.2.1 Alat yang digunakan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: petri disk, erlenmeyer, stirrer, batang L perata, bunsen, mikropipet, hot plate, tally counter, tabung tabung mikro 1,5 ml, *autoclave*, aluminium foil, kertas cakram, tisu, kapas, plastik wrap, *vortex*, inkubator, blue tip, yellow tip, batang oce, timbangan, labu ukur, gelas ukur, oven, tabung selai, kertas pembungkus, laminar, kertas label, lemari es/pendingin.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Metode yang digunakan merupakan metode *experiment* dengan rancangan percobaan yaitu rancangan acak kelompok (RAK) dengan 3 perlakuan dan 3 kali ulangan pada uji *in vitro* dan *in vivo*. Perlakuan yang dilakukan ialah pemberian konsentrasi daun kayu manis yang berbeda. Model statistik RAK yang digunakan berdasarkan Steel & Torrie (1993).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Ket:

$Y_{ij}$  = Data respon yang diamati pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  = Nilai tengah

$\tau_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$B_j$  = Pengaruh blok ke j

$\varepsilon_{ij}$  = Galat percobaan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

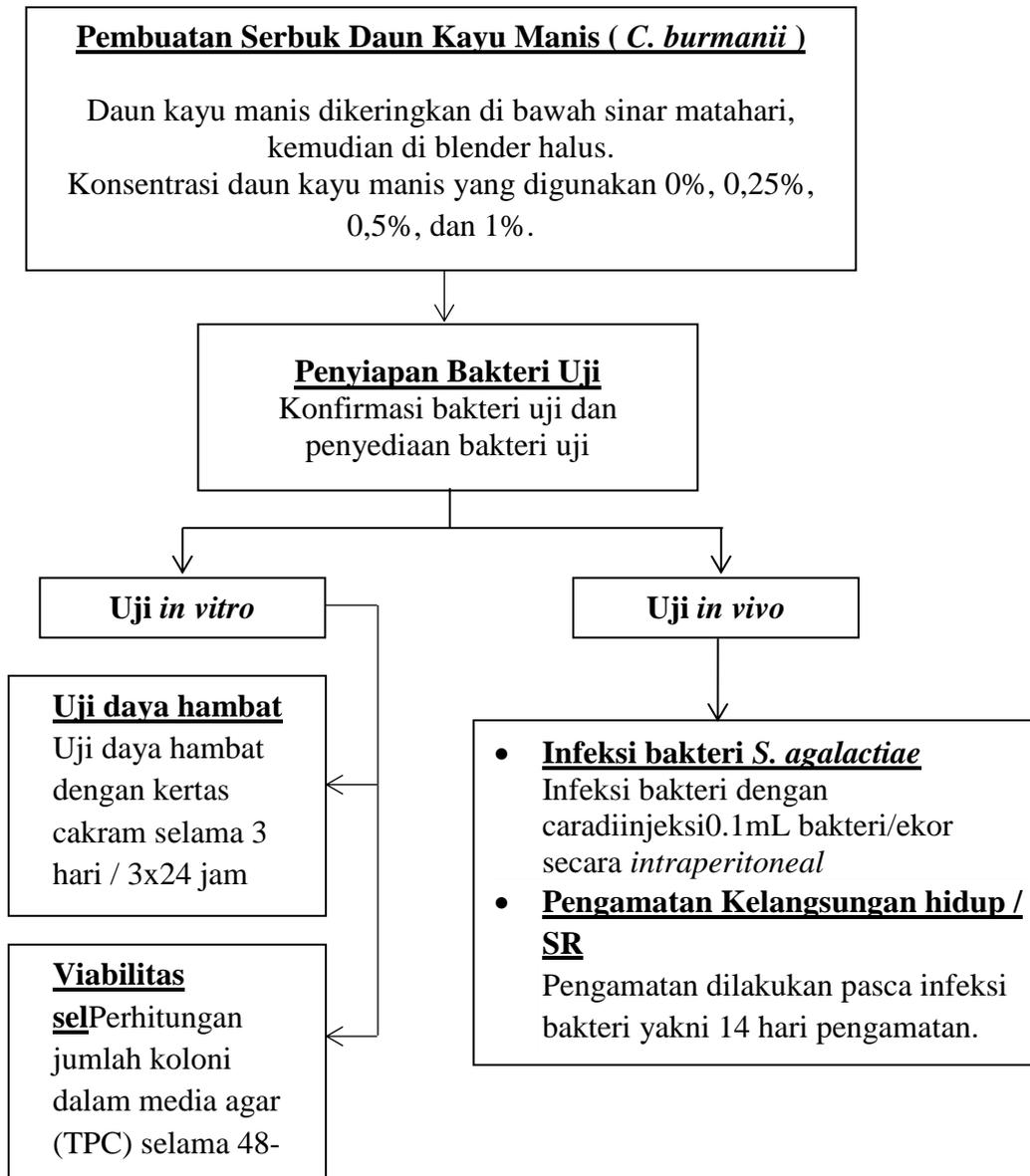
**Tabel 1.** Konsentrasi perlakuan uji *in vitro*

Perlakuan	Keterangan
<b>Kontrol</b>	0,9 ml aquades steril + 0,1 ml suspensi bakteri
<b>A</b>	(0,9 ml aquades steril + 0,25 % bubuk daun kayu manis) + 0,1 ml suspensi bakteri dengan ujiantang
<b>B</b>	(0,9 ml aquades steril + 0,5 % bubuk daun kayu manis) + 0,1 ml suspensi bakteri dengan ujiantang
<b>C</b>	(0,9 ml aquades steril + 1% bubuk daun kayu manis) + 0,1 ml suspensi bakteri dengan ujiantang

**Tabel 2.** Perlakuan pemberian pakan dengan penambahan daun kayu manis uji *in vivo*

Perlakuan	Keterangan
<b>Kontrol +</b>	Pemberian pakan komersil dengan ujiantang
<b>Kontrol -</b>	Pemberian pakan komersil tanpa ujiantang
<b>A</b>	Pemberian pakan & penambahan konsentrasi 0,25% bubuk daun kayu manis
<b>B</b>	Pemberian pakan & penambahan konsentrasi 0,5% bubuk daun kayu manis
<b>C</b>	Pemberian pakan & penambahan konsentrasi 1% bubuk daun kayu manis

Penelitian ini meliputi beberapa tahapan yaitu, pembuatan simplisia daun kayu manis, , penyiapan bakteri uji, uji *in vitro* dan *in vivo*. Seperti yang terlihat pada Gambar 5.



**Gambar 1.** Skema Alur Penelitian Efektivitas Daun Kayu Manis (*C. burmanii*) sebagai Antibakteria untuk Pencegahan Infeksi Bakteri *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

### 3.3.1 Persiapan ikan uji dan wadah penelitian

Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang berasal dari Instalasi Pembenuhan di Lamongan sebanyak 10 ekor/akuarium dengan rerata bobot 10 g. Tempat pemeliharaan berupa akuarium berukuran 60x35x30 cm<sup>3</sup> dengan volume air 20 liter. Sebelum diterapkan perlakuan, ikan nila diadaptasikan terlebih dahulu selama 10 hari.

### 3.3.2 Pembuatan serbuk daun kayu manis (*C. burmanii*)

Daun kayu manis dikeringkan pada udara terbuka (kering udara) tanpa terkena cahaya matahari langsung untuk menghindari kerusakan bahan aktif yang terdapat pada daun kayu manis. Pengerinan dilakukan sampai daun dapat dihaluskan dan diayak untuk mendapatkan serbuk daun kayu manis.

### 3.3.3 Konfirmasi bakteri uji

Isolat bakteri *S. agalactiae* tipe *non-hemolitik* terlebih dahulu diamati morfologi koloni, karakteristik biokimia dan sifat gram mengacu pada metode SNI 754.3 : 2009. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa isolat tersebut merupakan spesies bakteri yang diperlukan untuk kegiatan penelitian. Karakteristik bakteri (Tabel 5.) dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri yang digunakan melalui beberapa uji yang diterapkan meliputi pewarnaan gram, sifat biokimia, fisiologi bakteri dan identifikasi molekuler.

**Tabel 3.** Karakteristik morfologi, fisika dan biokimia *Streptococcus agalactiae*

No	Pengujian	Isolat N14G
1	Pewarnaan gram	Gram +
2	Motilitas	-
3	Oksidatif-fermentatif	Fermentatif +
4	Katalase	-
5	Bile salt	+
6	Pertumbuhan NaCl	+
7	Aesculin hydrolysis	-
8	D-mannitol	-
9	Aktivitas hemolitik	$\beta$ -hemolitik

Sumber: Hardi (2011)

### 3.3.4 Penyediaan bakteri uji

Isolat bakteri *S. agalactiae* yang digunakan merupakan isolat bakteri *S. agalactiae* N14G berasal dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan – Sempur, Bogor. Isolat stok bakteri *S. agalactiae* BHIA di agar miring diremajakan (*Fasase*) dengan mengkultur isolat pada media agar miring yang dilakukan sebanyak 2 kali. Penyiapan inokulan *S. agalactiae* dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu: 1. Mengkultur isolat bakteri dengan melakukan inokulasi biakan murni bakteri dari media agar miring BHIA ke dalam 10ml

mediacair TSB (*Trypticase soya broth*) kemudian diinkubasi pada suhu 29-30°C selama 24 jam. 2. Biakan yang diinkubasi 24 jam tersebut, kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan dalam 9 ml medium TSB baru, yang selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 29-30°C selama 24 jam setelah itu bakteri dipanen.

### **3.3.5 Persiapan pakan dan pemberian pakan**

Pakan yang digunakan pada penelitian ini berupa pellet terapung (F999) dengan kadar protein 38%. Pellet tersebut dicampur dengan serbuk daun kayu manis sesuai dengan konsentrasi perlakuan dan diberi putih telur 2% sebagai binder, setelah itu pakan dikering anginkan. Pemberian pakan dilakukan sebanyak 3 kali sehari pada pukul 08.00, 12.00, 16.00 WIB selama 30 hari secara *at satiation* sebelum ujiantang, setelah ujiantang ikan uji diberi pakan komersil dan dilakukan pengamatan selama 14 hari.

### **3.3.6 Infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae***

Setelah 30 hari ikan nila diberi pakan perlakuan, pada hari ke-31 dipuasakan dan selanjutnya pada hari ke-32 diuji tantang dengan bakteri *S.agalactiae* dan diinjeksi secara *intrapertoneal* sebanyak 0,1 mL suspensi sel/ekor. Ikan yang telah diinfeksi dipelihara selama 14 hari dan dilakukan pengamatan.

### **3.3.7 Parameter pengamatan**

#### **3.3.7.1 Uji *in vitro***

Pengujian *in vitro* dilakukan dengan uji zona hambat dan uji viabilitas dengan metode TPC (*Total Plate Count*).

### 3.3.7.1.1 Zona hambat

Ujidaya hambat dilakukan menggunakan kertas cakram yang telah direndam dalam larutan daun kayu manis selama 30 menit. Kertas cakram ditempel pada media agar (TSA) yang telah ditumbuhkan bakteri *Streptococcus agalactiae*. Setelah itu diinkubasi selama 48-72 jam dan dilihat zona bening seperti yang terlihat pada Gambar 6. Penilaian zona hambat menurut Susanto, Sudrajat dan Ruga tahun 2012, dikategorikan menjadi lemah ( $\leq 5$  mm), sedang (6-10 mm), kuat (11-20 mm), dan sangat kuat ( $\geq 21$  mm). Diameter zona hambat dapat diukur dengan rumus:

$$\frac{(D_v - D_s) + (D_h - D_s)}{2}$$

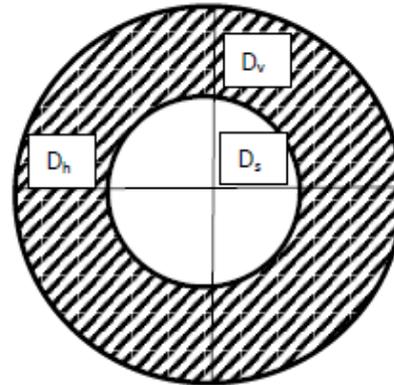
**Ket :**

D<sub>v</sub> = Diameter Vertikal

D<sub>s</sub> = Diameter sumur

D<sub>h</sub> = Diameter horizontal

 = Zona hambat



**Gambar 2.** Pengukuran Daerah Zona Hambat  
(Sumber: Susanto, Sudrajat dan Ruga, 2012)

### 3.3.7.1.2 Viabilitas dengan TPC (Total Plate Count)

Dwidjoseputro (2005) menyatakan bahwa viabilitas bakteri dihitung dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Persiapan yang dilakukan yakni menyiapkan *ependofe* sebanyak 4 buah. Masing-masing *ependofe* diisi dengan akuades steril dan ditambahkan serbuk kayu manis sesuai dengan konsentrasi yang akan diuji yaitu 0,25%, 0,5% dan 1%.

Pada perlakuan kontrol diisi 0,9 ml akuades tanpa daun kayu manis. Pada semua perlakuan ditambahkan 0,1 ml suspensi bakteri, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam. Pada hari kedua dari masing-masing campuran bakteri dengan serbuk daun kayu manis diencerkan berkala hingga  $10^6$  CFU/ml dan disebar pada media TSA sebanyak 50  $\mu$ l. Pengulangan 3x pada setiap perlakuan.

Selanjutnya sebaran bakteri pada media TSA diinkubasi kembali selama 48-72 jam. Pada hari ketiga dihitung jumlah koloni yang tumbuh dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{koloni per ml} = \text{jumlah koloni percawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

### 3.3.7.2 Uji *in vivo*

#### 3.3.7.2.1 Kelangsungan hidup *Survival Rate* (SR).

Rumus perhitungan menurut Nuryati S, Maswan NA, Alimuddin, Sukenda, Sumanantadinata K, Pasaribu FH, Soejoedono RD, SantikaA (2010) yaitu:

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan:

SR = Tingkat kelangsungan hidup (%)

N<sub>t</sub> = Jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

N<sub>o</sub> = jumlah ikan yang hidup pada awal ujiantang (ekor)

Tingkat kelangsungan hidup diamati selama 14 hari setelah ikan nila diinfeksi oleh bakteri *S.agalactiae* (Nurul, 2012).

### 3.3.8 Kualitas air

Parameter kualitas air yang diukur adalah suhu, oksigen terlarut (DO), pH, pada setiap harinya pemeliharaan. Satuan dan alat pengukuran disajikan pada Tabel 6. berikut ini:

**Tabel 4.** Parameter kualitas air yang diamati

Parameter	Satuan	Alat Ukur
Suhu	°C	Thermometer
Oksigen terlarut / Dissolved Oxygen(DO)	Mg/L	DO meter
pH	-	pH meter

### 3.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini yang meliputi Kelangsungan hidup (SR) dianalisa ANOVA dengan Minitab 16, selanjutnya akan dilakukan uji lanjut BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan selang kepercayaan 95%. Sedangkan data uji *in vitro* dan kualitas air diolah secara deskriptif.

#### 3.4.1 Analisis sidik ragam (ANOVA)

Analisis sidik ragam atau analisis variasi (ANOVA) merupakan salah satu cara untuk menguraikan ragam total menjadi komponen ragam. Dengan anova ini didapatkan pengujian perbedaan dua nilai tengah contoh atau lebih secara serentak (Sastrosupadi, 2007). Analisis variansi (ANOVA) digunakan untuk menganalisis data dari percobaan RAL maupun RAK yang telah dilakukan. Percobaan terdiri dari beberapa perlakuan dan beberapa ulangan yang dianalisis dengan rumus pada Tabel 7.

**Tabel 5.** Tabel analisis sidik ragam atau analisis variansi (ANOVA) RAK

SK	Db	JK	KT	F <sub>hitung</sub>	F <sub>5%</sub>	F <sub>1%</sub>
Perlakuan	t-1	JK P	JK P/(t-1)	KTP/KTG	....	....
Kelompok	r-1	JKK	JKK/(r-1)	KTK/KTG	....	....
Galat	(rt-1)-(t-1)	JK G	JK G/(r-1) (t-1)			
Jumlah	rt-1	JKP+JKG				

(Sumber: Sastrosupadi, 2007)

Jika dari perhitungan didapat  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka  $H_0$  ditolak,  $H_1$  diterima dinyatakan berbeda nyata dan harus dilakukan uji lanjut. Sebaliknya jika  $F_{hitung} < F_{tabel}$  maka  $H_0$  diterima dan percobaan dinyatakan tidak berbeda nyata sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjut.

#### 3.4.2 Uji Lanjut BNT (Beda Nyata Trekecil)

Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) atau uji LSD (*Least Significance Different*) adalah metode yang diperkenalkan oleh Ronald Fisher. Uji lanjut BNT atau LSD ini dilakukan untuk membandingkan nilai BNT dengan

beda rata-rata antara dua perlakuan. Jika selisih rata-rata perlakuan lebih besar dari nilai BNT itu berarti perlakuan berbeda nyata dan jika selisih rata-rata perlakuan lebih kecil dari nilai BNT mak perlakuan tidak berbeda nyata.

Uji lanjut BNT ini dilakukan ketika dalam perhitungan ANOVA hasilnya berbeda nyata atau  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Uji BNT dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$BNT_{\alpha} = t_{\alpha(\text{db galat})} \times \sqrt{\frac{2 \text{ KT Galat}}{r}}$$

Ket:

BNT = Beda Nyata Terkecil

t = Nilai jarak

KTG = Kuadrat Tengah Galat

r = Replikasi (jumlah ulangan)

$\alpha$  = Taraf nyata

db galat = derajat bebas galat

Interpretasi :

Nilai uji BNT yang diperoleh di tambhkan dengan nilai rerata dari parameter yang diamati. Nilai rerata di urutkan berdasarkan nilai terkecil ke nilai yang besar. Kemudian dari jumlah nilai tersebut di dapat notasi yang menyatakan antara dua perlakuan tersebut berbeda atau tidak.