

BAB III METODE PENELITIAN

(1) Disain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental laboratorium, tentang aktivitas antibakteri sediaan cacing tanah (*Lumbricus* sp) terhadap bakteri patogen antara lain *S.aureus*, *Streptococcus beta hemoliticus*, *S.flexneri* dan *Vibrio cholerae* invitro.

(2) Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pelaksanaan penelitian dikerjakan selama 4 bulan dari bulan September – Desember 2008 .

(3) Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ialah sebagai berikut:

- Medium: agar Mac Conkey, Nutrien agar, Media agar darah, *Brain heart infusion* cair.
- Larutan NaCl Fisiologis
- Larutan aquades steril
- Sediaan cacing tanah

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah cawan petri diameter 10 cm, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu spiritus, ose, pipet ukur, glassfirm, erlemeyer, autoklaf Jericho JE-350A, oven Memmert, laminar air flow Nuare tipe II, inkubator Memmert, timbangan Sartorius BP 160P, waterbath, termometer, kapas, kain flanel, panci infus.

(4) Bakteri Uji

Bakteri penguji yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari strain

oleh *S.aureus*, *Streptococcus Alfa hemoliticus*, *S.dysenteriae* dan *V.cholerae*, serta yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta .

(5) Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini yang merupakan variabel penelitian adalah:

- a. Variabel bebas: sediaan cacing tanah
- b. Variabel tergantung: kadar hambat minimal, kadar bakterisidal minimal
- c. Variabel terkontrol: strain bakteri uji, jumlah bakteri sebelum perlakuan, umur bakteri; suhu pengeraman bakteri, waktu pengeraman bakteri
- d. Variabel tidak terkontrol: zat aktif dalam sediaan cacing tanah kering (*Lumbricus sp*)

(6) Prosedur Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan sebagai berikut:

- Persiapan, berupa penyiapan alat dan bahan, sterilisasi alat, pembuatan medium yang diperlukan.
- Pembuatan sediaan cacing tanah (*Lumbricus sp*) dengan konsentrasi 50 gr%
- Penentuan kadar hambat minimal dari sediaan cacing tanah dengan metode seri pengenceran tabung.

Cara Kerja

a. Pembuatan sediaan cacing tanah

Dalam pembuatan sediaan cacing tanah pada penelitian ini, cacing tanah yang masih hidup dicuci bersih dan dijemur di bawah sinar matahari selama beberapa hari, dikeringkan dengan mesin pengering sampai kering dan dibuat serbuk dengan cara digiling (DepKes RI, 1985). Cara pembuatan sediaan cacing tanah dengan konsentrasi 50 gr% adalah dengan melarutkan 50 gr serbuk cacing tanah dengan akuades steril 100 ml. Saring dengan menggunakan kain flanel, tambahkan air secukupnya melalui ampas

b. Pemeriksaan sterilitas sediaan cacing tanah

Sediaan cacing tanah yang diperoleh setelah disaring dengan filter bakteri diuji kesterilannya dengan cara ditetaskan sebanyak 5 ml larutan sediaan kedalam 2 tabung perbenihan yang mengandung brain heart infusion cair. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika tidak terjadi kekeruhan pada tabung perbenihan maka sediaan cacing tanah dinyatakan steril.

c. Penyiapan bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan berupa *S.aureus*, *Streptococcus beta hemoliticus*, *S.flexneri* dan *V.cholerae*. Masing-masing biakan bakteri di subkultur dalam lempeng agardarah (untuk kuman gram positif) dan Mac Conkey (untuk kuman gram negative) selama 24 jam pada 37°C. Koloni yang tumbuh dipilih 4-5 koloni dengan menggunakan ose steril, diinokulasikan pada 2 ml media cair BHI, lalu diinkubasikan pada 37°C selama 2-5 jam sampai pertumbuhan bakteri tampak. Kemudian dibuat suspensi bakteri dengan cara diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis steril sampai kekeruhan sama dengan suspensi larutan standar Brown III yang diidentikkan dengan konsentrasi kuman sebesar 10^8 CFU/ml. Selanjutnya kuman tersebut diencerkan lagi dengan medium cair BHI sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (William dan Hansler, 1991).

c. Penentuan kadar hambat minimal sediaan cacing tanah dengan metode seri pengenceran tabung (*macro broth dilution*).

- Disediakan 120 tabung volume 5 ml steril untuk 4 seri pengenceran dengan 3 kali pengulangan, dimana setiap seri pengenceran dalam satu ulangan menggunakan 10 buah tabung.
- Untuk setiap satu seri pengenceran disediakan 10 tabung, ke dalam tabung ke-2

- Selanjutnya dimasukkan 1 ml larutan sediaan cacing tanah ke dalam tabung ke-1 dan ke-2, sehingga tabung ke-1 berisi larutan sediaan dengan konsentrasi 50 gr% dan tabung ke-2 berisi larutan sediaan dengan konsentrasi 25 gram%.
- Kemudian dilakukan pengenceran secara seri dari tabung ke-2 sampai dengan tabung ke-10, dengan cara memindahkan 1 ml larutan sediaan pada tabung ke-2 ke dalam tabung ke-3. tabung ke-3 digojog sampai homogen diambil 1 ml kemudian dipindahkan ke tabung nomor 4. demikian seterusnya sampai tabung ke-10 dipindahkan ke tabung ke-11. dengan demikian tabung dari nomor 1 sampai dengan tabung ke-10 memiliki konsentrasi sebagai berikut. Tabung ke-1 50 gr%, ke-2 25 gr%, ke-3 12,5gr%, tabung ke-4 6,25 gr%, tabung ke-5 3,125 gr%, ke-6 1,563 gr%, tabung ke-7 0,783 gr%, ke-8 0,391 gr%, ke-9 0,195 gr%, ke-10 0,098 gr%. Tabung ke-11 berisi sisa pengenceran sebagai kontrol sterilitas sediaan cacing tanah (kontrol negatif).
- Ke dalam tabung ke-1 sampai tabung ke-10 selanjutnya diisi masing-masing 1 ml larutan brain hearth infusion cair yang berisi suspensi bakteri uji dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Volume akhir dari tabung ke-1 sampai tabung ke-10 sebesar 2 ml. Maka konsentrasi akhir dari sediaan cacing tanah adalah sebagai berikut. Tabung ke-1 25 gr%, ke-2 12,5 gr%, ke-3 6,25 gr%, tabung ke-4 3,125 gr%, tabung ke-5 1,563 gr%, ke-6 0,781 gr%, tabung ke-7 0,391 gr%, ke-8 0,195 gr%, ke-9 0,098 gr%, ke-10 0,049 gr%.
- Selanjutnya seluruh tabung dari nomor 1 sampai nomor 10 diinkubasikan pada suhu 37° C, selama 24 jam. Sebagai kontrol sterilitas bahan dan kontrol pertumbuhan kuman , juga ikut diinkubasikan tabung ke-11 dan tabung yang hanya berisi suspensi bakteri uji (kontrol +)
- Diamati ada tidaknya pertumbuhan kuman dengan cara membandingkan kontrol positif.
- Kadar hambat minimal diperoleh dengan mengamati tabung subkultur yang tidak