

## TEKNIK PENENTUAN NILAI KONSENTRASI HAMBAT MINIMUM BAHAN HERBAL DENGAN CARA MIKRODILUSI

Edy Farid Wadjdy dan Setiadi

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

E-mail: [pefnisbpbpat@yahoo.com](mailto:pefnisbpbpat@yahoo.com)

### ABSTRAK

Bahan herbal merupakan bahan alami yang mengandung senyawa kimia yang mempunyai berbagai kegunaan dan bersifat aman, serta ramah lingkungan sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengendalian penyakit ikan budidaya air tawar. Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui teknik penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari bahan herbal dengan cara mikrodilusi. Metode ekstraksi yang digunakan dengan cara metode maserasi bahan herbal dengan pelarut berupa *aquadest* steril dan menggunakan bakteri uji *Aeromonas hydrophila* yang ditumbuhkan dalam media *muller hinton broth*, dan kemudian ditempatkan pada mikrowell 96 dengan perbandingan bakteri 20  $\mu$ L : ekstrak herbal 20  $\mu$ L : 160  $\mu$ L media *muller hinton broth* dengan dosis bertingkat 1  $\mu$ L/mL, 2  $\mu$ L/mL, 3  $\mu$ L/mL, 4  $\mu$ L/mL, dan 5  $\mu$ L/mL. Hasil yang diperoleh, bahwa nilai KHM yang paling tinggi terdapat pada ekstrak kunyit dengan dosis 2  $\mu$ L/mL dan nilai hambatnya sebesar 1,0011.

**KATA KUNCI:** ekstrak herbal; nilai KHM; *Aeromonas hydrophila*

### PENDAHULUAN

Bahan herbal merupakan bahan alami yang mengandung senyawa kimia yang mempunyai berbagai kegunaan, yang salah satunya bersifat sebagai senyawa antibiotika, imunostimulan, penenang, penambah nafsu makan, dan sebagainya. Adanya manfaat yang banyak terkandung di dalamnya diharapkan penggunaan bahan herbal mampu menanggulangi penyakit yang terjadi pada kegiatan budidaya ikan air tawar.

Tanaman herbal yang akan digunakan di dalam kegiatan ini adalah; Kipahit (*Tihonia diversifolia*) mengandung *quassinoid* yang bersifat oksidator pada dinding sel bakteri, sirih (*Piper betle* L.) biasa digunakan sebagai antibiotik alami untuk mengobati luka, borok, dan kulit melepuh; jambu biji (*Psidium guajava* L.) juga sering digunakan sebagai antibakteri; daun pepaya (*Carica papaya* L.) digunakan juga sebagai zat antibakteri dan anti parasit; kunyit (*Curcuma longa*) merupakan antibiotik alami untuk pengobatan luka borok dan mengkudu (*Orinda citrifolia* L.) sebagai imunostimulan (Lusiastuti & Taukhid, 2012).

Dalam penggunaannya bahan herbal seperti halnya bahan kimia lainnya juga mempunyai dosis tertentu yang mampu diterima oleh hewan. Oleh karena itu, semakin rendah dosis yang digunakan akan semakin baik,

namun perlu diketahui bahwa dosis terendah tersebut diharapkan masih mampu menghambat tumbuhnya bakteri patogen. Oleh karena itu, penentuan nilai konsentrasi hambat minimum bahan herbal perlu dilakukan untuk mengetahui hal tersebut. Salah satu pengujiannya adalah dengan menggunakan metode konsentrasi hambat minimum (KHM). KHM merupakan konsentrasi terendah bahan herbal yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dapat dilihat adalah adanya pertumbuhan koloni pada agar atau tampak adanya kekeruhan pada pembiakan cair jika bakteri masih hidup (Soleha, 2015). Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mengetahui teknik penentuan konsentrasi hambat minimum dari bahan herbal dengan cara mikrodilusi.

### BAHAN DAN METODE

#### Bahan

Bahan yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila*, media MHB (*Muller hinton Broth*), *aquadest* steril, herbal daun kipahit, sirih, mengkudu, pepaya, kunyit, jambu biji, dan alkohol teknis 96%.

#### Alat

Alat yang digunakan adalah *laminar flow*, *autoclave*, *inkubator shaker*, timbangan analitik, botol *schott*,

erlenmayer, microwell, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, batang penyebar *L glass*, *stirer*, *magnetic stirer*, dan *vortex*.

### Metode

Langkah-langkah dalam penentuan nilai KHM bahan herbal dengan cara mikrodilusi adalah sebagai berikut:

#### Persiapan Ekstrak Herbal

Menyiapkan beberapa jenis tanaman herbal di antaranya: daun kipahit, daun mengkudu, daun sirih, daun jambu biji, daun pepaya, dan rimpang kunyit kemudian ditimbang masing-masing herbal sebanyak 10 g dan direndam dalam 100 mL *aquadest* steril lalu diinkubasi selama 24 jam dalam *shaker* dengan kecepatan 90 rpm pada suhu ruang 28°C-30°C. Selanjutnya cairan herbal tersebut disaring menggunakan saringan halus sebanyak dua kali dan disaring kembali dengan kertas saring *Whatmann* berdiameter 0,5 mm. Hasil masing-masing ekstrak dimasukkan dalam botol *schott* 100 mL kemudian disimpan dalam *refrigerator* 4°C. Untuk uji KHM masing-masing ekstrak herbal dipindahkan dalam *microtube* 1,5 mL dengan dosis 1 µL/mL, 2 µL/mL, 3 µL/mL, 4 µL/mL, dan 5 µL/mL, hasil dari uji dosis terendah sebelumnya (Gambar 1).

#### Persiapan Bakteri Uji

Bakteri *Aeromonas hydrophila* ditumbuhkan pada media *muller hinton* agar dengan cara *di-streak* untuk mendapatkan satu koloni dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Setelah bakteri tumbuh diambil satu koloni untuk dikultur kembali ke dalam media MHB lalu diinkubasi selama 24 jam, kepadatan bakteri diukur menggunakan spektrometer dengan nilai OD 0,8 pada panjang gelombang 600 nm.

#### Persiapan Penghitungan Nilai KHM

Sumur *microwell plate* 96 disiapkan untuk uji KHM, dengan pengaturan sebagai berikut: pada baris A sumur-1 sampai 12 merupakan kontrol (+) yang diisi

dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* sebanyak 20 µL dan media MHB 180 µL. Adapun untuk perlakuan kolom-1 sumur-B sampai F diisi dengan herbal kipahit 20 µL (konsentrasi 1 µL/mL), bakteri *Aeromonas hydrophila* sebanyak 20 µL dan 160 µL media MHB. Berikutnya perlakuan kolom-2 sumur-B sampai F diisi herbal mengkudu 20 µL (konsentrasi 1 µL/mL), bakteri *Aeromonas hydrophila* sebanyak 20 µL dan 160 µL media MHB. Demikian juga kolom 3, 4, 5, dan 6 masing-masing diisi dengan herbal sirih, jambu biji, pepaya, dan kunyit berturut-turut dari sumur-B sampai F sebanyak 20 µL dengan konsentrasi 1 µL, 2 µL, 3 µL, 4 µL, dan 5 µL per mL. Kemudian masing-masing sumur ditambahkan bakteri sebanyak 20 µL dan 160 µL media MHB. Sedangkan untuk blanko dari masing-masing perlakuan digunakan kolom ke-7 sampai kolom-12 disesuaikan dengan perlakuan ekstrak herbal yang diuji dengan perbandingan ekstrak herbal sebanyak 20 µL dan media MHB 180 µL, sebagai contoh kolom sumur ke-1 (ekstrak daun kipahit) maka blankonya kolom ke-7 (perlakuan B-1 blanko B-7). Selanjutnya untuk kontrol (-) ditempatkan pada baris G-1 sampai G-12 yang hanya diisi dengan media MHB saja sebanyak 200 µL. Larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 18-24 jam selanjutnya dibaca *optical densitas* (OD) menggunakan alat *Elisa reader* dengan panjang gelombang 600 nm yang terkoneksi dengan komputer (Gambar 2).

### HASIL DAN BAHASAN

Hasil penentuan nilai KHM beberapa ekstrak herbal dengan cara mikrodilusi adalah seperti terlihat pada Tabel 1.

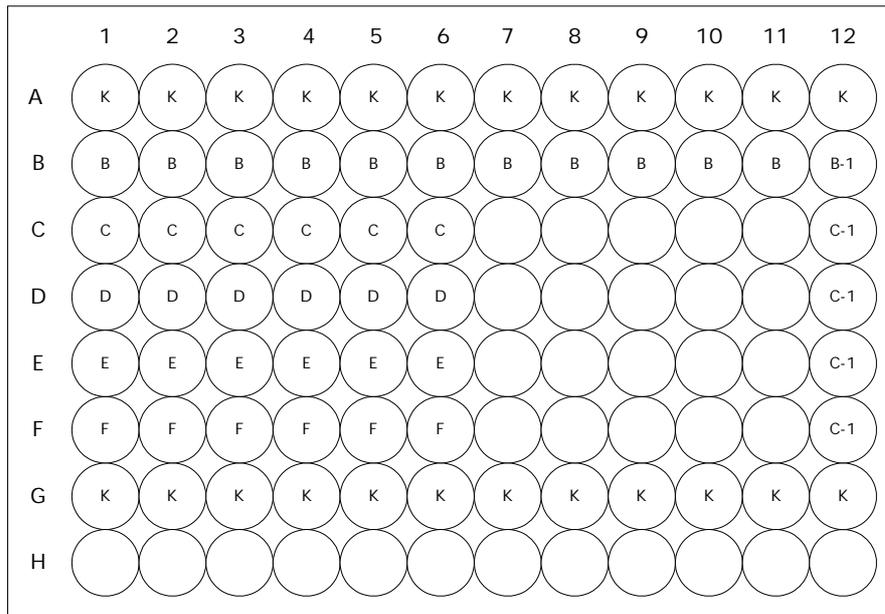
Berdasarkan Tabel 1, nilai KHM ditentukan dengan mengurangi hasil pembacaan pada kolom blanko pada jenis herbal yang sama dengan kolom sampel uji. Sebagai contoh pada jenis herbal kipahit dosis 1 µL/mL dengan nilai OD blanko 1,4619 dikurangi nilai OD sampel uji 1,2678 = 0,1941 kemudian dibandingkan dengan kontrol positif 1,4124. Dari hasil ini diketahui bahwa pertumbuhan bakteri telah



Gambar 1. Pembuatan larutan ekstrak herbal.



(A)



(B)

Gambar 2. Pengaturan peletakan sampel herbal dan pembacaan OD pada uji KHM dengan metode mikrodilusi (A); pengaturan peletakan sampel herbal uji KHM dengan metode mikrodilusi (B).

Tabel 1. Hasil pembacaan *optical density* (OD) dengan *elisa reader* untuk *absorbansi* sampel dengan panjang gelombang 600 nm

Kode	Abs	Sampel uji						Blanko					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Kipait	Mengkudu	Sirih	Pepaya	Jambu biji	Kunyit	Kipait	Mengkudu	Sirih	Pepaya	Jambu biji	Kunyit
A	K <sup>+</sup>	14,124	12,348	12,248	12,254	12,613	12,686	0,0731	0,0640	0,0550	0,0647	0,0561	0,0592
B	1 μL/ML	12,628	12,324	12,046	12,049	12,437	13,311	14,619	13,915	10,387	14,790	0,9975	13,009
C	2 μL/ML	12,768	12,369	12,184	12,057	12,119	0,4990	0,5578	0,4692	0,0600	13,403	0,8383	15,001
D	3 μL/mL	12,741	12,613	12,388	14,351	11,104	11,074	15,014	10,937	12,118	10,957	0,6841	14,736
E	4 μL/mL	13,021	0,9656	10,860	11,196	12,768	12,749	13,001	0,4101	12,024	13,318	10,571	13,795
F	5 μL/ML	13,214	12,646	13,039	11,944	12,411	12,503	12,607	14,381	15,261	14,068	0,9125	12,971
G	K <sup>-</sup>	0,0541	0,0576	0,0542	0,0559	0,0555	0,0540	0,0568	0,0614	0,0584	0,0630	0,0629	0,0628

menurun dan menunjukkan bahwa bahan herbal yang digunakan pada dosis tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Nilai KHM untuk mikrodilusi volume yang digunakan adalah 0,05 mL sampai 0,1 mL. Penurunan tingkat konsentrasi terendah menunjukkan hambatan

pertumbuhan bakteri menggunakan alat dengan satuan  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pada konsentrasi inokulan yang ditumbuhkan pada media *muller hinton*, serta lamanya inkubasi (Soleha, 2015).

#### KESIMPULAN

Beberapa ekstrak herbal memiliki sifat daya hambat yang berbeda terhadap aktivitas bakteri *A. hydrophila*. Adapun nilai KHM yang paling tinggi terdapat pada ekstrak kunyit dosis  $2 \mu\text{L}/\text{mL}$  dengan nilai hambat 1,0011.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Desy Sugiani selaku penanggung jawab Instalasi Penelitian

dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan (IP4I) Depok; dan Nunak Nafiqoh, M.Sc. peneliti IP4I, serta teman-teman teknisi yang telah membantu dalam penulisan makalah ini.

#### DAFTAR ACUAN

- Soleha. (2015). Uji kepekaan terhadap antibiotik. *Juke Unila*, 5(9), 119-123.
- Sugiani, D., Lusiastuti, A.M., & Novita, H. (2014). Uji aktifitas herbal pengendali penyakit untuk ikan lele.
- Tohir, A.M. (2010). Teknik ekstraksi dan aplikasi beberapa pestisida nabati untuk menurunkan palatabilitas ulat grayak (*spodoptera litura* Fabr.). *Buletin Teknik Pertanian*, 15(1), 37-40.