

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen. Eksperimen merupakan metode penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 1995).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena penelitian ini dilakukan di dalam laboratorium, sehingga lingkungan dianggap homogen. Penelitian dilakukan pada bakteri penyebab infeksi pada kulit yaitu *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 dengan menggunakan ekstrak (alkaloid) *Ageratum conyzoides* L. tipe liar yang tumbuh di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Kondisi tumbuhan *A. conyzoides* tersebut adalah tumbuhan yang sudah berbunga.

Ekstraksi menggunakan dua jenis pelarut yaitu metanol dan diklorometan. Sebelum dilakukan uji aktivitas antimikroba, dilakukan pembuatan kurva tumbuh untuk bakteri. Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode *disk-diffusion* dan *macro-dilution*.

Penelitian ini menggunakan empat jenis perbedaan konsentrasi baik untuk ekstrak (alkaloid) daun maupun akar *A. conyzoides* yaitu konsentrasi 30 g/ml; 40 g/ml; 50 g/ml; dan 60 g/ml dengan pengulangan sebanyak empat

kali. Kontrol positif dengan menggunakan *ampicilin* 50 µg/ml (Benli dan Yigit, 2008) dan kontrol negatif dengan Dimethylsulfoxide (DMSO) 1% (Fero *et al.*, 2003). Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat, nilai MIC dan nilai MBC dari setiap ekstrak (alkaloid) bagian tumbuhan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah tumbuhan *A. conyzoides* yang berada di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia sedangkan. Sampel yang digunakan adalah *A. conyzoides* yang sudah berbunga.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Mei 2011. Proses ekstraksi daun dan akar *A. conyzoides* dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi, pengujian senyawa ekstrak daun dan akar *A. conyzoides* dilaksanakan di Laboratorium Kimia, dan pengujian aktivitas antibakteri di Laboratorium Mikrobiologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Fisiologi dan Laboratoium Mirobiologi FPMIPA Universitas Pendidikan Inonesia. Alat-alat yang digunakan selama penelitian ini terdapat pada

Tabel 3.1, sedangkan daftar bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Daftar Alat Penelitian yang Digunakan

No.	Alat-Alat Laboratorium	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoclave	HL36AE	1 buah
2.	Batang pengaduk kaca	-	1 buah
3.	Beaker glass	-	5 buah
4.	Blender	GMC	1 buah
5.	Botol film	-	20 buah
6.	Botol semprot	-	1 buah
7.	Cawan petri	Normax 12x100mm	50 buah
8.	Colony counter	SIBATA	1 buah
9.	Corong	-	1 buah
10.	Corong pemisah	-	4 buah
11.	Cuvutte	Pyrex	5 buah
12.	Destilator	-	1 buah
13.	Gelas ukur	Pyrex 100 ml	1 buah
14.	Hot plate	RCH-3	1 buah
15.	Inkubator	Gallenkamp	1 buah
16.	Jangka sorong	Caliper	1 buah
17.	Jarum inokulasi	-	1 buah
18.	Kertas cakram	Whatman no. 1	10 keping
19.	Kertas saring	Whatman no. 1	5 lembar
20.	Labu Erlenmeyer	Pyrex 100 ml	5 buah
21.	<i>Laminar air flow</i>	-	1 buah
22.	Lampu spirtus	-	1 buah
23.	Lemari es	LG	1 buah
24.	Macro pipet	Socorex Calibra 822 1 ml dan 10 ml	@1 buah
25.	Micro pipet	Socorex Calibra 822 20-200 μ l	1 buah
26.	Oven	-	1 buah
27.	PH meter	Universal	1 kotak
28.	Pinset	-	1 buah
29.	Pipet tetes	-	1 buah
30.	Rak tabung	-	1 buah
31.	Spatula	-	1 buah
32.	Spectrofotometer	Milton Roy Spectronic 20D	1 buah
33.	Sumbat kapas	-	50 buah
34.	Tabung reaksi	Pyrex 13x150 mm	50 buah

35.	Timbangan mekanik	HF 300	1 buah
36.	Vortex mixer	Sibata TTM-1	1 buah
37.	Waterbath shaker	Eyela NTS-1300	1 buah

Tabel 3.2 Daftar Bahan Penelitian yang Digunakan

No.	Nama bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Agar-agar bakteriologi	Pro analyst	50 gram
2.	Akar dan daun <i>Ageratum conyzoides</i> L.	Kebun Botani UPI	Secukupnya
3.	Alkohol 70 %	-	50 ml
4.	Aluminium foil	-	1 gulung
5.	<i>Ampicillin</i>	Kimia farma	1 tablet
6.	Aquades	-	10 liter
7.	BaCl ₂	Pro analyst	1 gram
8.	Beef Ekstrak	-	15 gram
9.	Benang	-	1 gulung
10.	Biakan murni <i>Streptococcus pyogenes</i>	Isolat klinik ATCC 19615	1 tabung reaksi
11.	ddH ₂ O	-	2 liter
12.	Diklorometan	Pro analyst, merck	5 liter
13.	DMSO 1 %	Pro analyst, merck	50 ml
14.	Glicerol 85%	Pro analyst, merck	5 ml
15.	H ₂ SO ₄ 1 %	Pro analyst, merck	100 ml
16.	HCl 0,5 M	Pro analyst, merck	100 ml
17.	K ₂ HPO ₄	Pro analyst	1 gram
18.	Kain kassa	-	5 gulung
19.	Kapas	Gasindo	1 bungkus
20.	KH ₂ PO ₄	Pro analyst	1 gram
21.	Methanol	Pro analyst, merck	5 liter
22.	NaCl	Teknis	10 gram
23.	NaOH 4 N	Pro analyst	10 gram
24.	Pepton	Oxoid	50 gram
25.	Plastik anti panas	-	2 bungkus
26.	Spirtus	-	1 liter
27.	Tissue gulung	Tessa	10 gulung

F. Cara Kerja

Tahapan awal penelitian, dilakukan identifikasi tumbuhan *A. conyzoides* yang mengacu pada pada kunci identifikasi Backer dan Brink (1965). Bagian

A. conyzoides yang digunakan adalah bagian daun dan akar, sehingga terdapat dua jenis ekstrak, yaitu ekstrak (alkaloid) daun *A. conyzoides* dan ekstrak (alkaloid) akar *A. conyzoides*.

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat tahan panas dan bahan yang akan digunakan disterilisasi di dalam *autoclave* selama 15 menit dengan mengatur tekanan sebesar 1 atm dan suhu sebesar 121 °C sebelumnya dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas (Capuccino dan Sherman, 1987). Alat yang tidak tahan panas tidak dapat disterilisasi di dalam *autoclave*, sehingga alat-alat tersebut cukup dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70%.

2. Ekstraksi Bahan dan Identifikasi Alkaloid

Daun dan akar *A. conyzoides* dikeringkan dengan cara diangin-anginkan (tidak dibiarkan terpapar oleh sinar matahari). Selanjutnya sampel daun dan akar yang telah kering dihaluskan, (berat sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan) kemudian dilarutkan dengan pelarut metanol sampai tercampur dan terendam. Setelah itu, campuran tersebut disaring kemudian residunya kembali dibilas dengan metanol 10 ml sebanyak dua kali. Campuran metanol diuapkan dengan titik didih di bawah titik didih metanol yaitu di bawah 60°C ($\pm 50^{\circ}\text{C}$). Residu sisa hasil penguapan dicampur dengan 10 ml HCl 0,1 M. Selanjutnya, campuran residu dan HCl tersebut dibilas dengan 25 ml diklorometana sebanyak dua kali di dalam corong pemisah. Fase yang diambil dari corong pemisah adalah fase yang paling asam. Fase asam tersebut

kemudian dibasakan dengan larutan NaOH 4 N hingga pH 10. Setelah fase asam berubah menjadi basa, fase tersebut dibilas dengan diklorometan 25 ml sebanyak 3 kali. Setiap kali bilasan, fraksi yang diambil adalah fraksi diklorometan. Kumpulan fraksi diklorometan diuapkan dengan titik didih dibawah titik didih diklorometan ($<37^{\circ}\text{C}$ atau di suhu ruangan). Selanjutnya residu ditambahkan dengan DMSO 1% sebanyak satu ml (Fitriani, 1998).

Selanjutnya untuk mengidentifikasi alkaloid yang terkandung di dalam ekstrak, ekstrak diuji dengan menggunakan alat GCMS. Hasil ekstraksi lalu disimpan ke dalam botol film dengan kemasan yang baik dan disimpan di dalam lemari es (suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$).

3. Pembuatan Kurva Tumbuh dan Kurva Baku *Streptococcus pyogenes*

Metode pembuatan kurva tumbuh ini dinamakan metode Turbidimetri. Bakteri uji diaktivasi terlebih dahulu dengan menginokulasikan satu ose bakteri yang diambil dari biakan murni, ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi sepuluh ml medium *Nutrient Broth*, lalu diinkubasi pada *Waterbath Shaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakan bakteri yang telah diaktivasi tadi kemudian ditambahkan ke dalam labu Erlenmeyer lain yang berisi 90 ml medium *Nutrient Broth* lalu diinkubasi lagi dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 37°C .

Setiap interval waktu dua jam, dari labu kultur inokulum diambil sebanyak 5 ml, lalu dimasukkan ke dalam *cuvette*. Kemudian nilai absorbansi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm. Selanjutnya dibuat kurva tumbuh yang didasarkan pada hubungan nilai absorbansi (sumbu Y) dengan waktu (sumbu X). dari kurva tumbuh ini dapat diketahui umur biakan pada saat mencapai fase log dan selanjutnya dilakukan pembuatan kurva baku.

Pembuatan kurva baku didasarkan pada hasil pembuatan kurva tumbuh yaitu pada saat pertumbuhan bakteri mencapai fase log. Setelah itu, diambil 1 ml biakan ke dalam botol sampel yang berisi 9 ml aquades steril untuk pengenceran 10^{-1} , dari botol tersebut kemudian diambil lagi sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml aquades steril untuk pengenceran 10^{-2} begitu seterusnya hingga pengenceran 10^{-8} . Pada pengenceran 10^{-8} , 10^{-7} , dan 10^{-6} diambil 1 ml biakan, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian medium KNA dimasukkan. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh diukur setelah biakan berumur 24 jam. Dengan mengetahui jumlah bakteri dan nilai absorbansinya, maka dilakukan pembuatan kurva baku (Capuccino dan Sherman, 1987).

4. Pembuatan Standar Turbiditas Inokulum

Nilai densitas standar inokulum bakteri ekuivalen dengan 0,5 *McFarland Standar*. Untuk pembuatan larutan standar ini, disesuaikan dengan NCCLS (2003). Larutan 0,5 *McFarland Standar* dibuat dengan

komposisi 0,5 ml BaCl₂ 1% dan 99,5 ml H₂SO₄ 1%. Kekeruhan larutan diatur hingga bernilai antara 0,08 hingga 0,10 (dalam penelitian ini menggunakan absorbansi 0,096) pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm. Larutan yang telah dibuat disimpan dalam tabung *screw cap* dan dilapisi dengan aluminium foil, lalu ditutup rapat dan disimpan dalam suhu kamar. Larutan standar ini harus dikocok terlebih dahulu menggunakan *vortex* sebelum digunakan. Apabila terdapat partikel besar larutan harus diganti (NCCLS, 2003).

5. Uji Aktivitas Ekstrak (Alkaloid) *Ageratum conyzoides* L. terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*

a. Metode *Disk-diffusion*

Untuk uji antibakteri dengan metode *disk-diffusion*, digunakan medium Kaldu Nutrisi Agar (KNA). Sebanyak 9 ml medium ditempatkan ke dalam cawan petri, medium dibiarkan supaya membeku. Penutup setiap cawan petri diberi label sesuai dengan isolat dan konsentrasi ekstrak yang akan diuji.

Biakan bakteri yang sudah disiapkan sebelumnya disesuaikan kekeruhannya dengan 0,5 *McFarland Standar*. Kesesuaian tersebut dapat dilihat dengan cara melihat absorbansi biakan bakteri yang dihomogenkan dengan larutan NaCl 0,9% mencapai $\pm 0,096$ (sesuai dengan absorbansi 0,5 *McFarland Standar* yang digunakan dalam penelitian ini). Selanjutnya, sebanyak 200 μ l inokulum bakteri yang kekeruhannya telah sama dengan 0,5

McFarland Standar dimasukkan ke dalam cawan petri lalu diratakan dengan tongkat L steril, kemudian kultur dibiarkan mengering. Cakram steril direndam selama dua menit pada ekstrak dan setiap cakram ditempatkan dengan menggunakan pinset steril. Cakram ditekan oleh pinset steril untuk memastikan cakram menempel pada medium. Hal yang sama dilakukan untuk kontrol positif dan negatif, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Capuccino dan Sherman, 1987).

b. MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Menurut Rondon (Pramitha, 2009), untuk penentuan nilai MIC, biakan bakteri yang dipakai adalah biakan yang sebelumnya dibandingkan dengan larutan 0,5 *McFarland Standar* yang setara dengan 10^{6-8} cfu/ml. Biakan bakteri yang telah disiapkan sebelumnya diambil kira-kira 1 ose lalu dihomogenkan ke dalam larutan *ringers* NaCl 0,9%. Kemudian biakan dalam larutan tersebut dibandingkan dengan larutan 0,5 *Mc Farland Standar* sampai kekeruhannya sama seperti yang dilakukan untuk persiapan inokulum bakteri pada *disk-diffusion*. Untuk proses MIC, dimasukkan 100 µl ekstrak (alkaloid) ke dalam 4 ml NB dalam tabung steril. Selanjutnya sebanyak 900 µl inokulum yang sebelumnya telah disesuaikan dengan 0,5 *Mc Farland Standar* dimasukkan ke dalam tabung steril tadi. Setiap tabung ditutup dengan penutup kapas. Setelah penambahan inokulum tabung

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum mendapatkan nilai MIC. Prosedur yang sama dilakukan untuk setiap jenis ekstrak.

Penentuan nilai MIC ditentukan dengan cara membandingkan biakan bakteri dan ekstrak yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan medium dan ekstrak (parameter jernih) secara kasat mata. Sebelum dibandingkan secara kasat mata, kultur berusia 24 jam dan parameter jernih dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* terlebih dahulu. Nilai MIC merupakan nilai konsentrasi kultur berusia 24 jam satu tingkat sebelum konsentrasi yang memiliki kejernihan sama dengan medium dan ekstrak.

c. MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Uji aktivitas untuk nilai MBC dilakukan dengan memindahkan 100 µl inokulum dari setiap tabung uji MIC setelah pengamatan MIC selesai dilakukan kemudian dimasukkan ke dalam medium KNA yang telah disiapkan dengan teknik cawan tuang, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nilai MBC dicatat dimana pada konsentrasi ekstrak terendah dapat menyebabkan tidak lebih dari satu koloni bakteri yang tumbuh pada medium KNA (Fabio *et al*, 2007).

G. Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistika melalui *SPSS 16 for windows*. Uji normalitas (*Kolmogrov Smirnov*) dan uji homogenitas mengawali analisis data. Selanjutnya karena data yang diperoleh berdistribusi normal dan

homogen maka, maka selanjutnya uji yang dilakukan adalah uji parametrik berupa uji regresi linear, uji *two-way ANOVA*, uji Tukey, dan uji T Independen.

