

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen, yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 1983).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena penelitian ini dilakukan di dalam laboratorium sehingga data dianggap homogen. Penelitian dilakukan pada bakteri penyebab infeksi pada kulit yaitu *S. pyogenes* dengan menggunakan ekstrak *A. conyzoides* tipe liar yang berada di sekitar Kebun Botani Biologi Universitas Pendidikan Indonesia.

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *Soxhlet* dan *Destilator*. Ekstraksi menggunakan satu jenis pelarut yaitu metanol. Sebelum dilakukan uji aktivitas antimikroba, dilakukan pembuatan kurva tumbuh untuk bakteri. Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode *disc-diffusion* dan *macrodilution* (NCCLS, 2003).

Penelitian ini menggunakan 8 jenis perbedaan konsentrasi yaitu konsentrasi 10 mg/ml; 25 mg/ml; 50 mg/ml; 75 mg/ml; 100 mg/ml; 250 mg/ml; 500 mg/ml dan 750 mg/ml dari ekstrak methanol *A. conyzoides* (Okwori *et al.*, 2007).

Pengulangan sebanyak 3 kali (Owlia *et al.*, 2007), kontrol positif dengan menggunakan *Amphicillin* 10 µg/ml (Benli dan Yigit, 2008) dan 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 bagian tumbuhan.

C. Populasi dan sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah tumbuhan *A. conyzoides*, sedangkan sampel adalah *A. conyzoides* tipe liar yang berada di kebun botani UPI Bandung.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Juli 2009 yang dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudi No. 229 Bandung.

E. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. 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 : Alat-alat penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Mikroskop binokuler	Merk Shimadzu S12 –D180 F	1 buah
2.	<i>Hot plate</i> dan <i>Magnetic stirrer</i>	Merk EYELA, RSCH - 3	1 buah
3.	<i>Cuvete</i>	Pyrex	2 buah
4.	<i>Autoclave</i>	Merk Hirayama Mode HC36At	1 buah
5.	Vorteks	Merk SIBATA	1 buah
6.	Tabung <i>effendorf</i>	1,5 ml	50 buah
7.	Timbangan Analitik	Merk AND, HF 300	1 buah
8.	<i>Becker</i> gelas	Pyrex 600 ml;1000 ml	2 buah
9.	Penggaris	Milimeter (mm)	1 buah
10.	Cawan Petri	Pyrex; $\varnothing = 9$ cm	30 buah
11.	Lup inokulasi	P = 22,5 cm; = 5 mm	1 buah
12.	Tabung reaksi	Pyrex	50 buah
13.	Rak tabung	kayu	3 buah
14.	Gelas ukur	Pyrex 100 ml	1 buah
15.	Pipet	kaca	2 buah
16.	Mikropipet 1 ml dan 20-200 μ l	Merk SIBATA	1 buah
17.	Lemari pendingin	PT25.221.03,021.BM	1 buah
18.	Batang pengaduk	P = 29,5 cm	2 buah
19.	Spatula	Logam	2 buah
20.	Sumbat kapas	Kapas berlemak	50 buah
21.	Lumpang dan alu	porselein	1 buah
22.	corong	kaca	1 buah
23.	<i>Waterbath shaker</i>	EYELA NTS-1300	1 buah
24.	<i>Soxhlet</i>	pyrex	1 buah

25.	<i>Destilator</i>	<i>pyrex</i>	1 buah
26.	Inkubator	<i>gallenkamp</i>	1 buah
27.	Spektrofotometer	<i>Milton Roy Spectronic 20D</i>	1 buah
28.	Lampu spirtus	-	1 buah
29.	Kertas saring	<i>Whatman no. 1 60x61</i>	3 lembar
30.	Kertas cakram	Steril 6 mm	200 keping
31.	Jangka sorong	Caliper	1 buah

Tabel 3.2 : Daftar bahan-bahan penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah	Spesifikasi
1.	Akar dan daun <i>Ageratum conyzoides</i>	secukupnya	
2.	Metanol	2 liter	<i>ProAnalyst, Merck</i>
3.	Aquades	30 liter	-
4.	<i>Nutrient agar</i>	secukupnya	Oxoid
5.	BaCl ₂	1.175 g	<i>Pro analyst, Merck</i>
6.	H ₂ SO ₄	1 ml	<i>Pro analyst, Merck</i>
7.	Biakan bakteri <i>S. pyogenes</i>	secukupnya	Strain murni
8.	<i>Amphicillin</i>	secukupnya	Sigma USA
9.	DMSO 1%	100 ml	-
10.	Plastik tahan panas	2 bungkus	-
11.	<i>Beef Extract</i>	secukupnya	Difco
12.	Pepton	secukupnya	Oxoid
13.	NaCl	secukupnya	-

F. Langkah Kerja

Tahapan awal penelitian, dilakukan identifikasi tumbuhan *A. conyzoides* sesuai dengan Backer (1965). Bagian *A. conyzoides* yang digunakan adalah bagian daun dan akar, sehingga terdapat dua jenis ekstrak, yaitu ekstrak metanol daun *A. conyzoides* dan ekstrak metanol akar *A. conyzoides*.

1. Ekstraksi Bahan

Tumbuhan *A. conyzoides* bagian daun dan akar dipisahkan, lalu dikeringkan dalam suhu ruang hingga kering. Setelah tumbuhan kering sempurna, tumbuhan dihaluskan hingga berbentuk serbuk (simplisia). Simplisia sebanyak 10 gram dibungkus dengan kertas saring, lalu dimasukkan ke dalam *Soxhlet* yang sebelumnya diisi dengan 100 ml metanol. Lalu *soxhlet* dipanaskan dalam penangas air hingga mencapai suhu 64,7 °C. Proses ekstraksi ini dilakukan selama enam jam. Setelah enam jam, pelarut diuapkan hingga pelarut habis dengan menggunakan destilator. Setelah pelarut habis, hasil ekstraksi ditimbang lalu disimpan ke dalam botol dengan kemasan yang baik dan disimpan di dalam lemari es (Fitriani, 1988).



Gambar 3.1 Alat-Alat Ekstraksi



2. Kurva Tumbuh Bakteri

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 10 ml medium *Nutrient Broth*, lalu diinkubasi pada *Water Bath 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 *cuvete*. Kemudian nilai absorbansi dihitung dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 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.

Waktu pencuplikan ditentukan berdasarkan kurva tumbuh, yaitu pada jam ke-4, 6, dan 8. Setelah itu, diambil sebanyak 5 ml inokulum kemudian dimasukkan ke dalam *cuvette* untuk dihitung nilai absorbansi. Bersamaan dengan itu, diambil 1 ml biakan ke dalam botol sampel yang berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran 10^{-1} , dari botol tersebut kemudian diambil lagi sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml akudes steril lain 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 *Nutrient* agar dimasukkan. Biakan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung setelah biakan berumur 24 jam. Dengan mengetahui jumlah bakteri dan nilai absorbansinya, maka dilakukan pembuatan kurva baku (Cappuccino & Sherman, 1987).

3. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak

Ekstrak hasil ekstraksi yang berupa pasta dibuat stok 1000 mg/ml. pasta tersebut ditimbang hingga mendapatkan berat 1000 mg lalu dilarutkan ke dalam 1 ml DMSO 1%. Untuk penggunaan selanjutnya diencerkan kembali dengan pelarut DMSO 1% sehingga mendapatkan konsentrasi yang diinginkan. Hal tersebut dilakukan untuk ekstrak metanol daun maupun akar *A. conyzoides*.

4. Pembuatan Standar Turbiditas Inokulum

Nilai densitas standar inokulum *equivalen* dengan 0,5 *McFarland* standar. Pembuatan larutan standar disesuaikan dengan *protocol* NCCLS, (2003).

5. Pengujian Antibakteri

a. Metode *Disk-diffusion* (Kirby-Bauer)

Untuk uji antibakteri dengan metode *disk-diffusion*, digunakan medium *Nutrient* agar. Sebanyak 9 ml medium ditempatkan ke dalam cawan Petri, medium dibiarkan supaya membeku. Penutup setiap cawan Petri diberi label sesuai dengan isolat dan konsentrasi agen yang akan di uji.

Biakan bakteri disesuaikan kekeruhannya dengan 0,5 *McFarland* Standar. Sebanyak 200 μl inokulum bakteri dimasukkan ke dalam cawan Petri lalu diratakan dengan tongkat L steril, lalu kultur dibiarkan mengering. Cakram steril direndam selama dua menit pada ekstrak dan setiap cakram ditempatkan dengan menggunakan pinset steril. Cakram ditekan oleh tongkat L 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 (Cappuccino & Sherman, 1987).

b. MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan medium *Nutrient broth*. Sebanyak 4 ml NB dimasukan ke dalam tabung steril. Sebanyak 100 μL Larutan ekstrak dimasukan. Lalu sebanyak 900 μL inokulum dimasukkan ke dalam tabung tadi. Untuk tabung kontrol negatif dengan DMSO 1% serta untuk kontrol positif dengan antibiotik *amphicillin* dilakukan dengan cara yang sama. Setiap tabung ditutup dengan penutup kapas. Setelah penambahan inokulum tabung diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Setelah itu diamati pertumbuhan atau nilai MIC-nya (NCCLS, 2003).

c. MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Uji aktivitas untuk nilai MBC dilakukan dengan memindahkan 100 μl dari setiap tabung uji MIC kemudian dimasukkan ke dalam medium padat yang telah

disiapkan dengan teknik *spread plate*, lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Nilai MBC dicatat dimana pada konsentrasi ekstrak terendah tidak lebih dari satu koloni bakteri yang tumbuh pada medium *Nutrient Agar* (Fabio *et al*, 2007).

G. Analisis Data

Uji statistika yang digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak akar dan daun *A. conyzoides*. L terhadap pertumbuhan *S. pyogenes* yaitu dengan menggunakan One Way ANOVA. Analisis menggunakan menggunakan program SPSS versi 12.0 *for window* dengan tingkat kepercayaan 95%.

