

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode eksperimen. Penelitian yang menggunakan metode eksperimen yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2005).

#### B. Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena penelitian dilakukan di laboratorium dengan kondisi yang relatif homogen. Penelitian dilakukan pada bakteri penyebab infeksi kulit, yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan ekstrak alkaloid *Ageratum conyzoides* L. tumbuh liar dan sudah berbunga yang berada disekitar kebun botani Universitas Pendidikan Indonesia. Bagian tumbuhan *A. conyzoides* L. yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian daun dan akar.

Pembuatan kurva tumbuh bakteri *P. aeruginosa* dilakukan sebelum uji aktivitas antibakteri. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *disc-diffusion* untuk uji aktivitas (Cappuccino & Sherman, 1987) dan *macro-dillution* untuk nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) (NCCLS, 2003) dan MBC (*Minimum Bacterial concentration*) (Agoramoorthy *et al.*, 2007, Akinyemi *et al.*, 2005).

Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 g/ml, 40 g/ml, 50 g/ml, 60 g/ml baik daun maupun akar dengan pengulangan sebanyak empat kali, dengan kontrol negatif DMSO 1 % dan kontrol positif antibiotik *Tetracyclin* 5 mg/ml (Mahato & Chaudary, 2005). 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 dalam penelitian ini adalah tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. tumbuh liar sedangkan untuk sampel tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. tumbuh liar yang berada di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia.

### **D. Tempat penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret sampai bulan Juni 2011 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Kimia dan Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia.

### **E. Alat dan bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Alat Penelitian yang Digunakan

No.	Alat-Alat Laboratorium	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoclave	HL36AE	1 buah
2.	Botol semprot	-	1 buah
3.	Batang pengaduk kaca	-	1 buah
4.	Cawan petri	Noermax 12x100 mm	25 buah
5.	Corong	-	1 buah
6.	Colony counter	SIBATA	1 buah
7.	Jangka sorong	Caliper	1 buah
8.	Inkubator	Gallenkamp	1 buah
9.	Jarum inokulasi	-	2 buah
10.	Gelas ukur	Pyrex 100 ml	1 buah
11.	Kertas saring	Whatman no.1	3 lembar
12.	Laminar air flow	-	1 buah
13.	Micro pipet	100-1000 $\mu$ l SOCOREX CALIBRA 822	@ 1 buah
14.	Lampu spirtus	-	1 buah
15.	Jangka sorong	Caliper	1 buah
16.	Pinset	-	2 buah
17.	Makro pipet	5 ml; 10 ml SIBATA	@1 buah
18.	Beaker glass	Pyrex	@ 2 buah
19.	Rak tabung	-	1 buah
20.	Hot plate	RCH-3	1 buah
21.	Spatula	-	2 buah
22.	Timbangan mekanik	HF-300	1 buah
23.	Tabung reaksi	Pyrex 13x150 mm	50 tabung
24.	Waterbath shaker	EYELA NTS-1300	1 buah
25.	Kertas cakram	Whatman 6 mm	200 keping
26.	Destilator	-	1 buah
27.	Spectrofotometer	MILTON ROY spectronic 20D	1 buah
28.	Labu Erlenmeyer	250 ml; 500 ml Pyrex	@ 1 buah
29.	Cuvutte	Pyrex	2 buah
30.	Botol film	-	30 buah
31.	Blender	GMC Blender	1 buah
32.	Vortex mixer	SIBATA TTM-1	1 buah
33.	Ph meter	UCHIDA KT-1A	1 buah
34.	Corong pemisah	-	4 buah
35.	Oven	-	1 buah
36.	Pipet tetes	-	5 buah
37.	Sumbat kapas	-	50 buah

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

Tabel 3.2 Bahan Penelitian yang Digunakan

No.	Nama bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Daun dan akar <i>Ageratum conyzoides</i> L.	Diambil disekitar Kebun Botani UPI	-
2.	Biakan murni <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolat klinik	1 tabung reaksi
3.	Methanol	Analyst, Merck	2,5 liter
4.	Aquades	-	10 liter
5.	HCl 0,5 M	-	100 ml
6.	NaOH 4 N	-	100 ml
7.	Diklorometan	Pro analyst, Merck	2,5 liter
8.	DMSO 1 %	-	100 ml
10.	Beef Ekstrak	-	1 kg
11.	Pepton	-	50 gram
12.	Spirtus	-	100 ml
13.	Alumunium foil	-	1 kotak
14.	Plastik anti panas	-	1 bungkus
15.	Tissue gulung	Tessa	5 gulung
16.	Kain kassa	-	5 lembar
17.	Kapas	-	1 bungkus
18.	Benang	-	1 gulung
19.	<i>Tetracyclin</i> 5 mg/ml	Kimia farma	2 tablet
20.	Alkohol 70 %	-	2 liter
21.	NaCl	Teknis	50 Ram

## F. Langkah Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap perlakuan.

### 1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan ini meliputi pengumpulan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Bagian tumbuhan *A. conyzoides* L. yang akan digunakan adalah daun dan akar.

## 2. Tahap Pelaksanaan

### a. Ekstraksi Bahan dan Identifikasi Alkaloid *A. conyzoides* L.

Sebelumnya, daun dan akar *A. conyzoides* L. dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, tidak terpapar cahaya matahari secara langsung sampai tidak mengandung air. Sampel daun dan akar *A. conyzoides* L. dihaluskan dengan blender sampai lembut. Serbuk daun dan akar yang telah diperoleh (berat sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan) dilarutkan dalam pelarut metanol sampai terendam, diaduk sampai filtrat terpisah dengan ampas kemudian disaring dengan kertas saring. Residu dibilas dengan metanol sebanyak dua kali masing-masing 10 ml metanol. Selanjutnya metanol diuapkan sampai kering pada suhu 60°C dalam *Waterbath*. Residu di dispersikan dengan 10 ml HCl 0,5 M, kemudian dicampurkan dengan 25 ml diklorometan sebanyak dua kali pada corong pemisah. Fase yang memiliki pH asam diambil dan dibasakan dengan NaOH 4 N sampai pHnya 10. Selanjutnya ekstrak ditambahkan lagi dengan 25 ml diklorometan pada corong pemisah lain. Dalam corong pemisah akan terbentuk dua fase, fase yang diambil adalah fase diklorometan. Penambahan 25 ml diklorometan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Fase diklorometan diuapkan pada suhu ruangan sampai benar-benar kering, kemudian ditambahkan 1 ml DMSO 1% dan disimpan pada suhu 4°C (Fitriani, 1998).

Hasil ekstraksi tersebut diuji kandungan kimianya (GCMS) di Laboratorium Kimia dengan membawa hasil ekstraksi sampel daun dan

akar. Kualitas ekstrak dapat terjaga dengan memasukkan ekstrak ke dalam botol film dan disimpan pada pendingin dengan suhu 4°C.

b. Sterilisasi

Bahan, media dan alat tahan panas yang digunakan disterilkan dengan *autoclave* menggunakan uap air jenuh bertekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan cara dibilas alkohol 70%.

c. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri *P. aeruginosa*

Bakteri uji diaktivasi terlebih dahulu dengan menginokulasikan 1 ose bakteri yang di ambil dari biakan murni, ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 10 ml medium NB (Nutrient Broth) lalu diinkubasi pada *Waterbath Shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakan bakteri yang telah diaktivasi tadi kemudian ditambahkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 90 ml medium NB lalu di inkubasi lagi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Labu ini adalah kultur inokulum. Metode yang digunakan untuk membuat kurva tumbuh ini dinamakan metode Turbidimetri karena yang diukur adalah nilai absorbansi kultur menggunakan *spectrophotometer*. Setiap interval waktu dua jam selama 24 jam, dari labu kultur diambil 5 ml lalu dimasukkan ke dalam *cuvette*. Kemudian nilai absorbansi dihitung dengan *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 600 nm. Kurva tumbuh dibuat berdasarkan hasil hubungan nilai absorbansi (sumbu Y) dengan waktu (sumbu X). Dari kurva tumbuh ini dapat diketahui umur biakan

pada saat mencapai fase log. Pada fase log inilah ditentukan laju pertumbuhan dan waktu generasi *P. aeruginosa* sehingga umur inokulum untuk uji aktivitas dapat dilakukan (Cappuccino & Sherman, 1987).

d. Pembuatan kurva baku bakteri *P. aeruginosa*

Pembuatan kurva baku didasarkan pada hasil pembuatan kurva tumbuh untuk menentukan fase log. Dalam pembuatan kurva baku ini perlakuan awal sama dengan pembuatan kurva tumbuh. Bedanya, setelah biakan bakteri yang telah diaktivasi ditambahkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml medium NB, bakteri di inkubasi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C selama waktu yang dibutuhkan untuk mencapai fase logaritmik.

Setelah diinkubasi mencapai waktu fase logaritmik, diambil 5 ml inokulum kemudian dimasukkan ke dalam *cuvette* untuk dihitung nilai absorbansi. Bersamaan dengan itu, diambil 1 ml biakan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril untuk pengenceran  $10^{-1}$  lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Dari tabung  $10^{-1}$  kemudian diambil lagi sebanyak 1 ml dan dimasukkan lagi kedalam 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 kemudian dimasukkan ke dalam *Nutrien Agar*. Biakan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni bakteri uji yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *colony counter* sehingga didapat waktu terbaik untuk dijadikan inokulum (Cappuccino & Sherman, 1987).

#### e. Pembuatan Standar Turbiditas Inokulum

Nilai densitas standar inokulum ekuivalen dengan 0,5 *mcFarland standard*. Pembuatan larutan standar ini disesuaikan dengan NCCLS (2003). Campuran yang akan digunakan sebelumnya diaduk secara konstan untuk mempertahankan suspensi. Densitas yang tepat untuk standar turbiditas ini dihitung dengan menggunakan *spectrophotometer* 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 dihomogenkan menggunakan *vortex* sebelum digunakan. Apabila terdapat partikel besar, larutan harus diganti.

### 3. Tahap Perlakuan

#### a. *Disc-diffusion*

Uji mikroba dengan metode *disc-diffusion*, digunakan medium *Nutrient Agar* dengan teknik *Spread-plate*. Medium *Nutrient Agar* dipanaskan hingga mencair, lalu sebanyak 9 ml ditempatkan ke dalam cawan petri. Biakan bakteri disesuaikan kekeruhannya dengan 0,5 *mcFarland standard*. Lalu sebanyak 0,2 ml inokulum bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri lalu diratakan dengan tongkat L spade steril, lalu dibiarkan meresap. Cakram steril direndam selama 2 menit pada ekstrak dan setiap cakram ditempatkan dengan menggunakan pinset steril. Cakram ditekan dengan menggunakan pinset steril untuk memastikan cakram menempel pada medium. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24



jam dan diukur zona penghambatan berdasarkan diameter area bening di sekitar cakram kertas dengan menggunakan jangka sorong (Cappuccino & Sherman, 1987).

b. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Biakan bakteri dari *Nutrient Agar* 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.

Uji aktivitas untuk menentukan nilai MIC ini menggunakan medium *Nutrient Broth*. Tabung reaksi steril disiapkan, lalu sebanyak 4 ml medium NB dimasukkan ke dalam tabung. Setelah itu 100  $\mu\text{L}$  larutan ekstrak ditambahkan ke dalam tabung, lalu sebanyak 900  $\mu\text{L}$  inokulum dimasukkan ke dalam tabung tadi. Inokulum yang digunakan kekeruhannya sama setelah dibandingkan dengan 0,5 *mcFarland standard*.

Biakan bakteri diambil sebanyak 1 ml kemudian dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,9 % (0,9 g dalam 100 ml aquades steril). Setiap tabung tutup dengan penutup kapas. Setelah penambahan inokulum tabung di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu diamati pertumbuhan dan nilai MICnya.

Penentuan nilai MIC ditentukan dengan cara membandingkan biakan bakteri dan ekstrak yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan biakan bakteri dan ekstrak berusia 0 jam secara kasat mata. Sebelum dibandingkan secara kasat mata, kultur berusia 24 jam dan 0 jam

dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* terlebih dahulu. Nilai MIC merupakan nilai satu tingkat sebelum konsentrasi terendah saat kekeruhan kultur berusia 24 jam sama dengan kultur berusia 0 jam.

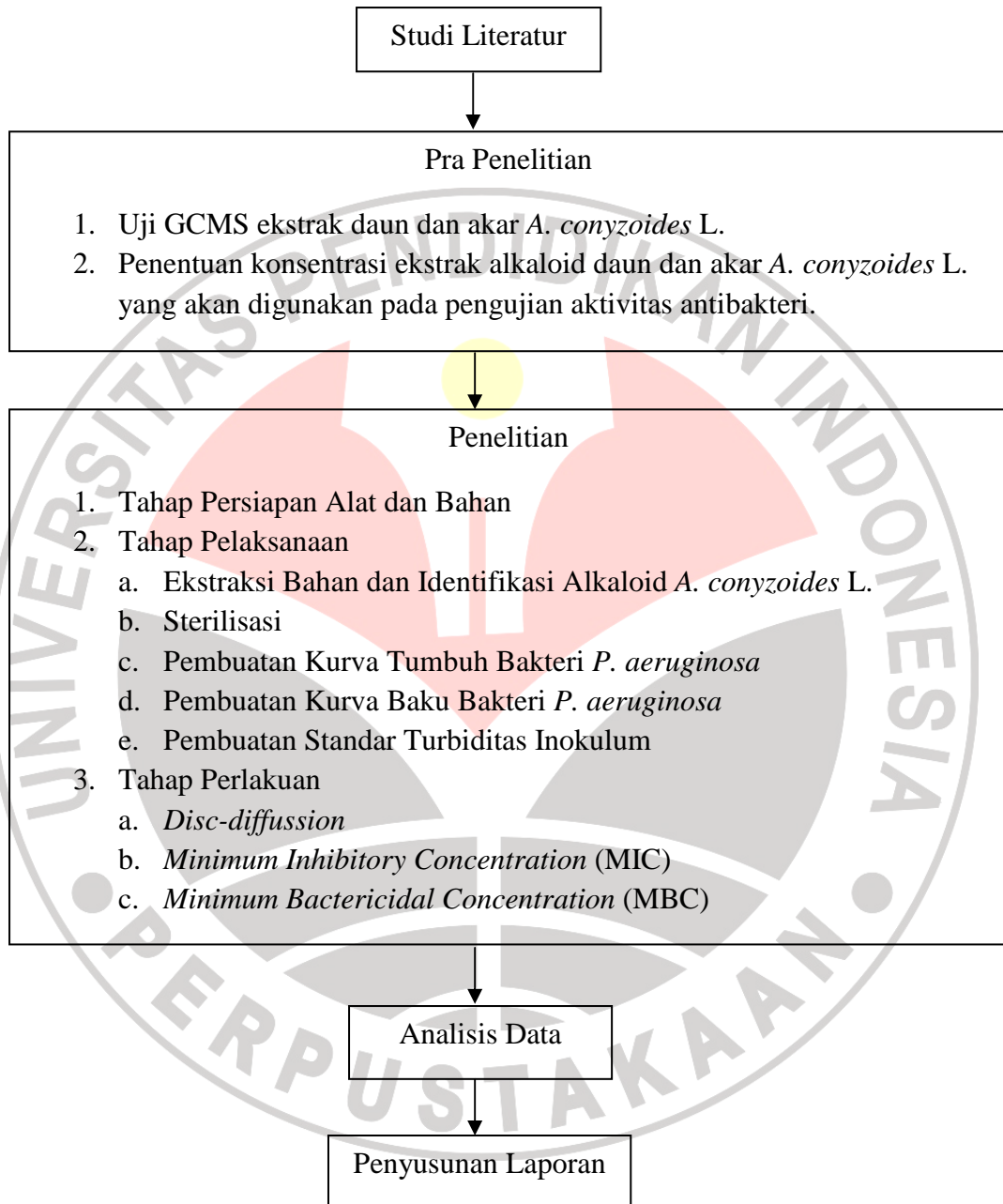
c. *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Uji aktivitas untuk nilai MBC dilakukan dengan memindahkan 100 µl dari setiap tabung uji MIC ke dalam medium padat yang telah disiapkan dengan teknik *Pour plate*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nilai MBC diperoleh dengan melihat pertumbuhan koloni bakteri, nilai konsentrasi ekstrak bakteri terendah yang mampu menghambat koloni bakteri sehingga tidak lebih dari satu koloni bakteri yang tumbuh pada medium padat.

### G. Uji Statistik

Uji statistik yang digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides* L. terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* yaitu dengan menggunakan uji ANOVA dengan syarat data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen. Oleh karena itu, sebelum menggunakan uji ANOVA data terlebih dahulu diuji menggunakan uji Normalitas dan uji Homogenitas pada masing-masing jenis ekstrak. Selanjutnya menentukan jenis ekstrak mana yang lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* digunakan uji Tukey.

## H. Alur Penelitian



Gambar 2.5 Diagram Alir Penelitian