

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yakni penelitian yang bertujuan untuk membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 2005).

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri endofit yang terdapat dalam akar *Vetiveria zizanioides*, sedangkan sampel dari penelitian ini adalah lima isolat biakan murni bakteri endofit akar *V. zizanioides*. Sampel didapatkan dari hasil penelitian Permatasari (2011). Permatasari (2011) melakukan isolasi dari akar *V. zizanioides* di Perkebunan Usar Kamojang, Kabupaten Garut.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan Desember 2013 sampai dengan Juni 2013 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

D. Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Adapun daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yakni :

1. Tahap Persiapan

Semua peralatan dan medium yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi dengan cara sterilisasi basah yakni dengan cara memasukkannya ke dalam *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm.

2. Tahap Penelitian

a. Subkultur Isolat dari *Cryo* pada medium padat

Sebanyak lima isolat bakteri yang diawetkan dalam *cryo* penelitian sebelumnya ditumbuhkan kembali atau disub kultur ke dalam medium agar miring. Medium Luria Bertani digunakan untuk subkultur dan produksi metabolit sekunder dari isolat A (*Lysinibacillus sphaericus*), isolat M (*Acinetobacter* sp.), isolat H (*Pantoea* sp.) dan isolat K (*Bacillus* sp). Sedangkan medium King's B digunakan untuk subkultur dan produksi metabolit sekunder dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* (Battu & Reddy, 2009).

b. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri

Pembuatan kurva tumbuh bakteri bertujuan untuk mengetahui waktu panen yang tepat dari isolat bakteri yang ditumbuhkan. Adapun untuk produksi metabolit sekunder bakteri, pemanenan dilakukan pada saat bakteri mengalami fase stasioner (Brock & Madigan, 1991). Pembuatan kurva tumbuh bakteri ini dilakukan dengan metode turbidimetri yakni dengan mengukur *optical density* (OD) dari bakteri endofit akar *V. zizanioides* menggunakan alat spektrofotometer. Sebanyak satu ose bakteri diinokulasikan pada 10 ml medium cair, kemudian diinkubasi pada *water bath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, kultur bakteri dipindahkan pada 90 ml medium cair dan diinkubasi kembali pada *water bath shaker* dengan kecepatan 120 rpm

pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, setiap satu jam sekali kultur bakteri diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 600 nm (Cappuccino & Sherman, 1987).

c. Skrining Fase Stasioner Bakteri

Proses skrining fase stasioner bakteri dilakukan dengan melakukan uji antibakteri dari supernatan isolat bakteri selama fase stasioner terhadap bakteri patogen. Adapun bakteri patogen yang digunakan diantaranya adalah *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *P. aeruginosa*.

d. Ekstraksi Metabolit Sekunder

Isolat bakteri ditumbuhkan dalam 100 ml medium cair sampai mencapai fase stasioner yang sesuai dengan hasil skrining fase stasioner bakteri sebelumnya. Kultur bakteri dipindahkan kedalam tabung 1,5 steril kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan bagian pellet dan supernatan. Supernatan dari kultur bakteri ini dipindahkan pada labu pisah dan diberi etil asetat untuk proses ekstraksi. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dipekatkan pada *vacuum evaporator* pada suhu 40°C untuk mendapatkan metabolit sekunder (Ahamed, 2012). Ekstrak metabolit sekunder yang didapatkan ditimbang kemudian dilarutkan dalam DMSO 1% dan disimpan pada suhu 4°C untuk proses uji aktivitas antimikroba dan identifikasi metabolit sekunder yang terdapat di dalamnya.

e. Uji Aktivitas Antimikroba

Ekstrak metabolit sekunder bakteri yang diperoleh selanjutnya diuji aktivitas antimikroba (*bio assay*) dengan metode difusi cakram. Adapun bakteri patogen yang digunakan adalah *E. coli*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa*. Sebelum dilakukan uji aktivitas antimikroba, isolat bakteri patogen yang diuji dibuat suspensinya terlebih dahulu dengan cara menginokulasikan satu ose kultur bakteri ke dalam 9 ml aquades steril,

kemudian dihomogenkan dengan cara di divorteks dan diukur kekeruhannya sampai mencapai mencapai 0,5 standar McFarland (10^8 cfu/mL) (Sashidaran *et al.*, 2011).

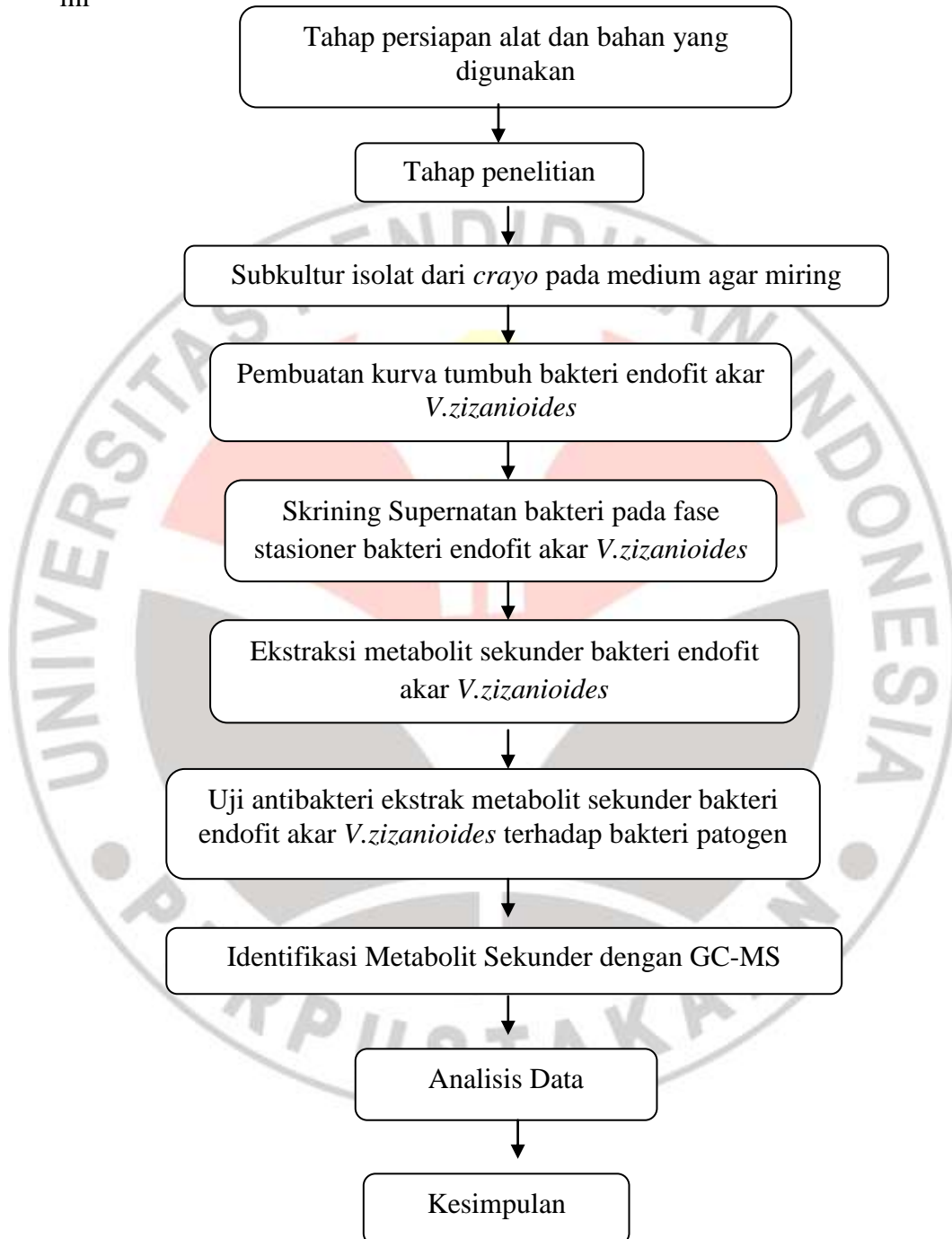
Sebanyak 1 ml suspensi bakteri patogen dituangkan ke dalam cawan Petri steril, dan ditambahkan dengan 10 ml Luria Bertani agar kemudian dihomogenkan. Selanjutnya cakram steril yang berukuran 6 mm diletakkan pada medium agar dan ditetesi dengan 20 μ l ekstrak metabolit sekunder bakteri yang digunakan. Selanjutnya cawan Petri ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk melihat zona hambat (Sashidaran *et al.*, 2011). Zona hambat ini diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan mengukur diameter dari zona hambat yang dihasilkan (Cappuccino & Sherman, 1987).

f. Identifikasi metabolit sekunder dengan metode GC-MS

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan selanjutnya diidentifikasi dengan menggunakan GC-MS. GCMS merupakan alat yang digunakan untuk identifikasi dan kuantisasi senyawa organik yang bersifat mudah menguap dan semivolatil dalam campuran yang kompleks (Hites, 1997). Pengujian GC-MS ini dilakukan di laboratorium instrument Kimia, FPMIPA-UPI. Sampel yang diinjeksikan sebanyak 0,2 μ l, sedangkan suhu injektor dan detektor yang digunakan sebesar 270°C dan 290°C. Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium dengan laju kecepatan sebesar 1,32 mL/menit.

F. Alur Penelitian

Alur penelitian dari penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar 3.1** di bawah ini



Gambar 3.1

Alur penelitian