

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif (Nazir, 1998).

B. Populasi dan sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endorizosfer *Ageratum conyzoides*, sedangkan sampel dari penelitian ini adalah enam isolat biakan murni bakteri endorizosfer *A. conyzoides* yaitu B14 (*Shewanella*), B15 (*Pseudomonas*), I13 (*Brochothrix*), I14 (*Kurthia*), I18 (*Corynebacterium*), dan G11 (*Listeria*).

C. Waktu dan lokasi pengamatan

Penelitian ini dimulai dari bulan Januari 2013 sampai dengan Juni 2013 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FPMIPA UPI Bandung.

D. Alat dan bahan

Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 2.

E. Langkah kerja

1. Tahap persiapan

Pada tahap persiapan ini dilakukan pengecekan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Semua alat-alat kaca dan plastik dibersihkan dan khusus untuk alat-alat kaca dilakukan sterilisasi panas lembab menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 – 20 menit dengan tekanan 1,5 atm. Dilakukan juga pembuatan medium Luria Agar (LA) dan Luria *Broth* (LB) yang akan digunakan untuk subkultur keenam isolat dari cryo dan pembuatan kurva tumbuh keenam bakteri tersebut.

Semua medium yang dibuat dilakukan sterilisasi panas lembab menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 – 20 menit dengan tekanan 1,5 atm

2. Tahap penelitian

a. Subkultur bakteri

Sebanyak enam isolat bakteri endorizosfer dari penelitian sebelumnya yaitu B14, B15, I13, I14, I18, dan G11 disubkultur pada medium LA untuk peremajaan dan diinkubasi pada suhu 37°C.

b. Pembuatan kurva tumbuh

Metode yang digunakan dalam pembuatan kurva tumbuh ini adalah metode turbidimetri. Sebanyak satu ose bakteri uji diinokulasikan ke dalam medium aktivasi yaitu 10 ml LB dalam Erlenmeyer bervolume 50 ml dan diinkubasi selama 24 jam pada *water bath shaker* dengan suhu 37°C dan agitasi 121 rpm. Setelah kultur berumur 24 jam, kultur dipindahkan pada 90 ml LB dalam Erlenmeyer bervolume 250 ml dan diinkubasi kembali pada *water bath shaker* dengan suhu 37°C selama 24 jam dan agitasi 121 rpm. Pada inkubasi kedua ini dilakukan pengukuran turbiditas kultur, setiap jamnya diambil sebanyak 700 µl kultur dan dimasukkan ke dalam *cuvete* untuk dilakukan pengukuran turbiditas dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm, dengan menggunakan medium LB tanpa penambahan isolat sebagai *blanko* (Matlock, 2011; Sezonov, 2007). Kurva tumbuh bakteri uji akan didapat dari nilai absorbansi (sumbu Y) kultur pada tiap-tiap waktu inkubasi (sumbu X) (Cappucino dan Sherman, 1987). Dari hasil kurva tumbuh ini akan didapatkan umur bakteri tersebut untuk mencapai fase stasioner dimana pada fase tersebut bakteri akan memproduksi metabolit sekunder.

c. Skrining supernatan yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri patogen

Pada tahapan ini dilakukan pengkulturan terhadap keenam isolat bakteri endorizosfer *A. conyzoides* hingga mencapai fase stasioner. Setelah mencapai fase stasioner sebanyak 1 ml kultur dimasukkan ke dalam tabung mini sentrifuga steril untuk dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit (Ahamed, 2012). Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas penghambatan dari tiap-tiap supernatan terhadap pertumbuhan bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Eschericia coli* dengan nilai turbiditas yang setara dengan standar 0,5 McFarland (Pro Lab Diagnostic, 2012).

Sebanyak 1 ose masing-masing koloni bakteri uji yang berumur 18 - 24 jam diencerkan dengan aquades steril yang ditempatkan pada tabung reaksi steril secara terpisah. Lalu dilakukan pengukuran nilai turbiditas menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan aquades steril tanpa inokulum sebagai kontrol. Bakteri uji yang digunakan adalah yang memiliki nilai turbiditas yang sama dengan standar 0,5 McFarland. Jika terlalu tinggi atau rendah maka dilakukan pengenceran dengan aquades steril atau penambahan bakteri uji, hingga mencapai nilai turbiditas yang setara dengan nilai turbiditas standar 0,5 McFarland (Andrews, 2008). Setelah itu sebanyak 1 ml bakteri uji dan 9 ml medium LBA dituangkan pada cawan petri steril dan dihomogenkan.

Sebanyak 20 µl supernatan dari tiap-tiap kultur isolat bakteri endorizosfer *A. conyzoides* diujikan terhadap tiap-tiap bakteri uji dengan menggunakan metode difusi cakram (Coyle, 2005) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat dari tiap-tiap supernatan yang diujikan dengan menggunakan jangka sorong (Cappuccino dan Sherman, 1987).

d. Ekstraksi metabolit sekunder

Isolat bakteri endorizosfer *A. conyzoides* yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji dikultur kembali pada 100 ml medium LB hingga mencapai waktu inkubasi yang ditentukan berdasarkan hasil skrining. Kemudian kultur dipindahkan ke dalam tabung mini sentrifuga steril dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pelet dan supernatan. Supernatan yang telah terpisah dipindahkan ke labu pemisah dan diekstrak menggunakan etil asetat untuk mendapatkan larutan ekstrak metabolit sekunder (Ahamed, 2012).

Larutan ekstrak metabolit sekunder yang didapat dievaporasi pada vakum evaporator dengan suhu 40°C hingga terbentuk ekstrak kering dari larutan tersebut (Garcia *et al.*, 2012). Ekstrak kering yang terbentuk kemudian dilarutkan dalam DMSO 1% dengan konsentrasi 40 mg/ml lalu disimpan dalam botol fial gelap pada suhu 4°C (Liang *et al.*, 2012).

e. Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak supernatan ini dilakukan kepada tiga isolat bakteri patogen yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Eschericia coli*. Bakteri uji diencerkan dalam aquades steril hingga mencapai konsentrasi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml atau setara dengan nilai turbiditas standar 0,5 McFarland (Pro Lab Diagnostic, 2012). Lalu sebanyak 1 ml bakteri uji dituangkan pada cawan Petri bersama 9 ml medium LA dan dihomogenkan.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram (Coyle, 2005). Sebanyak 20 µl masing-masing ekstrak diujikan dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam dilakukan pengukuran zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Cappuccino dan Sherman, 1987). Untuk melihat potensi sensitivitas ekstrak metabolit sekunder

maka besaran zona hambat yang terbentuk dibandingkan dengan skala sensitivitas obat antibiotik (**Tabel 3.1**) (Sharma *et al.*, 2009).

Tabel 3.1 Skala sensitivitas obat antibiotik

No	Diameter zona hambat (mm)	Sensitivitas
1	$\mu < 6$	Tidak sensitif
2	$6 < \mu < 9$	Sensitivitas rendah
3	$9 < \mu < 12$	Sensitivitas sedang
4	$\mu > 12$	Sensitivitas tinggi

Ket: μ (zona hambat pada kultur)

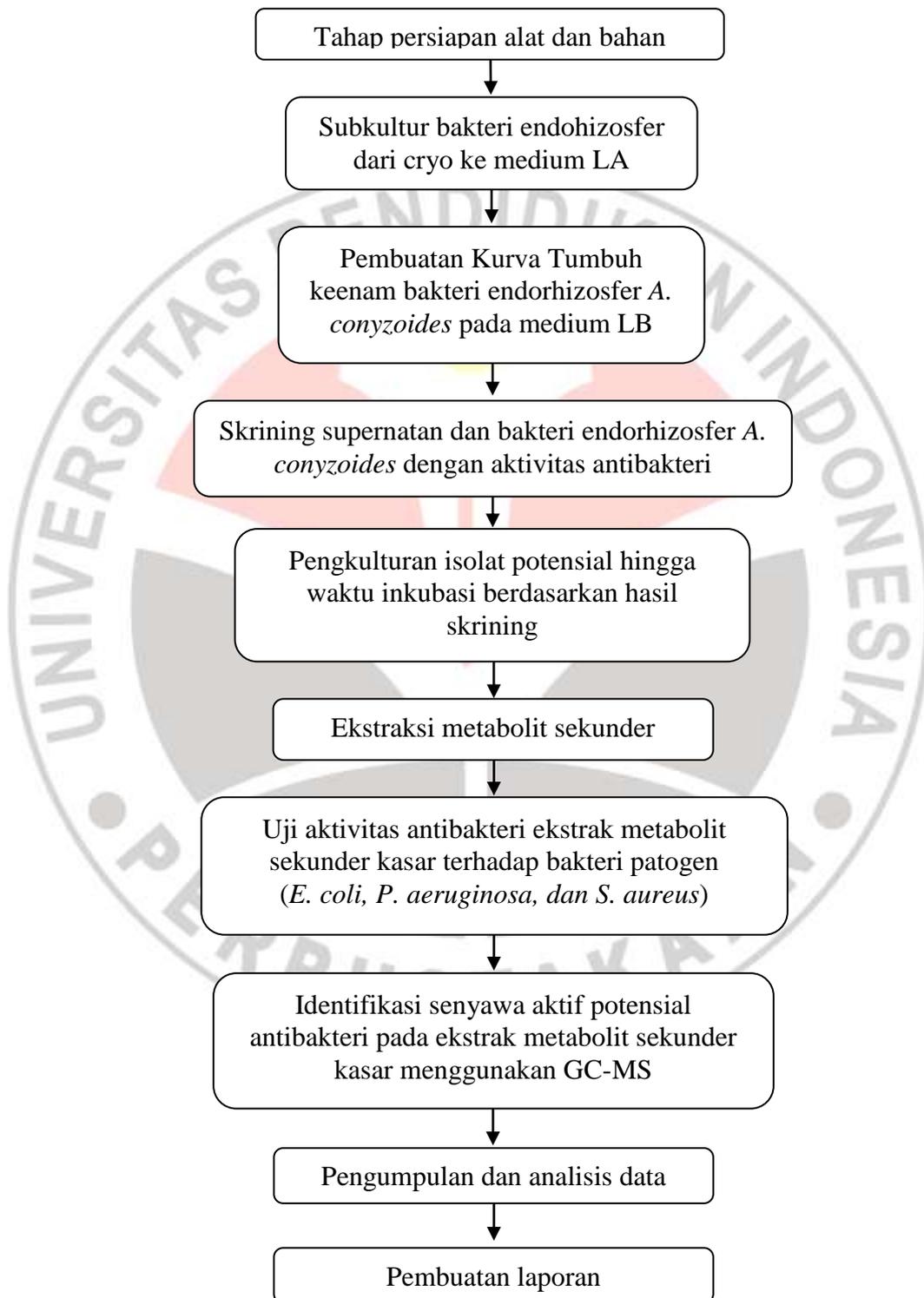
Sumber: Sharma *et al.*, 2009

- f. Identifikasi senyawa pada ekstrak kasar metabolit sekunder dengan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

Tahap identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui identitas senyawa aktif pada ekstrak kasar metabolit sekunder dari bakteri endorizosfer *A. conyzoides*. Identifikasi senyawa potensial antibakteri pada ekstrak kasar dilakukan dengan menggunakan GC-MS, tahap ini sekaligus merupakan sebagai tahapan analisis data pada penelitian ini.

F. Alur penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 3.1 Alur penelitian