

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen yaitu penelitian yang melakukan uji coba atau pengamatan khusus untuk membuktikan sesuatu yang bersifat meragukan dan dalam kondisi yang ditentukan oleh peneliti (Nindhia, 2013). Desain dari penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana setiap perlakuan dalam perobaan dirancang dengan kondisi yang relatif homogen (Nindhia, 2013). Penelitian ini menggunakan jamur *Candida albicans* dan *Trichophyton mentagrophytes* sebagai objek yang diberi perlakuan oleh supernatan dari tujuh isolat bakteri endofit (M, O, H) dari akar tanaman *Ageratum conyzoides* dan (I13, I14, B14, B15) dari akar tanaman *Vetiveria zizanioides*. Isolat bakteri endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari penelitian sebelumnya.

Penelitian ini diawali dengan melakukan subkultur ke-7 isolat bakteri endofit dari *cryopreservation* ke dalam medium Luria Bertani (LB) agar. Setelah itu dilakukan uji antagonis untuk mengetahui potensi ke-7 isolat bakteri endofit dalam menghambat pertumbuhan jamur *C.albicans* dan *T.mentagrophytes*. Apabila isolat tersebut berpotensi sebagai antifungi, maka dilakukan pengukuran kurva tumbuh masing-masing isolat bakteri endofit dan kurva tumbuh dari masing-masing jamur uji. Pengukuran kurva tumbuh isolat bakteri endofit dilakukan untuk mengetahui fase stasioner dari bakteri endofit sedangkan pengukuran kurva tumbuh jamur dilakukan untuk mengetahui fase logaritmik jamur uji. Setelah itu dilakukan uji aktivitas antifungi menggunakan metode difusi cakram dengan konsentrasi kultur 10 mg/ml dan 20 mg/ml dari masing-masing isolat bakteri endofit. Kontrol positif untuk jamur *C.albicans* menggunakan nystatin 100.000 ppm sedangkan kontrol positif untuk *T.mentagrophytes* menggunakan ketokonazol 10.000 ppm. Kontrol negatif menggunakan akuades steril. Setiap perlakuan dalam penelitian ini dilakukan beberapa pengulangan yang didasarkan pada perhitungan di bawah ini.

$$t \quad (r-1) \geq 20$$

$$16 \quad (r-1) \geq 20$$

$$16r - 16 \geq 20$$

$$16r \quad \geq 36$$

$$r \quad \geq 2,25 \sim 3$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka dilakukan 3 kali pengulangan pada setiap perlakuan. Parameter yang diukur dalam penelitian ini ialah diameter zona hambat dari setiap perlakuan yang diberikan. Data diameter zona hambat yang telah didapatkan kemudian dianalisis menggunakan SPSS 16.0 *for windows*.

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini ialah bakteri endofit dari akar tanaman obat *A.conyzoides* dan *V.zizanioides*. Sedangkan sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah tujuh isolat bakteri endofit, yakni isolat M, O, dan H yang berasal dari akar tanaman *V.zizanioides* serta isolat I13, I14, B14, dan B15 yang berasal dari akar tanaman *A.conyzoides*. Ke-7 isolat bakteri endofit tersebut didapatkan dari penelitian sebelumnya.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juli 2016. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan atau prosedur penelitian, diantaranya:

1. Tahap Persiapan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan. Alat-alat dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas untuk disterilisasi dalam autoklaf selama 15-20 menit dengan tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C.

2. Tahap Penelitian

a. Subkultur Isolat Bakteri Endofit

Sebanyak tujuh isolat bakteri endofit dari penelitian sebelumnya telah diawetkan dengan metode *cryopreservation*. Ke-7 isolat bakteri endofit tersebut diantaranya isolat M, O, H, I13, I14, B14, dan B15 ditumbuhkan kembali atau disubkultur ke dalam medium agar miring. Medium yang digunakan ialah medium Luria Bertani (LB) agar steril. Komposisi medium LB agar dapat dilihat pada Lampiran 2.

b. Uji Antagonis Isolat Bakteri Endofit Terhadap *C.albicans* dan *T.mentagrophytes*

Uji antagonis ini dilakukan berdasarkan metode Widowati (2013). Pengujian ini dilakukan dengan metode inokulasi titik. Sebanyak tujuh sampel isolat bakteri endofit ditumbuhkan dalam 5 ml LB agar selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolat jamur *C.albicans* dan *T.mentagrophytes* juga ditumbuhkan dalam 10 ml medium cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) (komposisi medium PDB dapat dilihat pada Lampiran 2) dan diinkubasi menggunakan *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 121 rpm pada suhu kamar. Setelah 24 jam, sebanyak 1 ml suspensi jamur *C.albicans* dan *T.mentagrophytes* dimasukkan ke dalam cawan Petri steril. Kemudian dimasukkan 9 ml medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) cair steril (komposisi medium PDA dapat dilihat pada Lampiran 2) yang sudah hangat kuku. Suspensi jamur patogen dan medium PDA tadi dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Metode inokulasi titik dilakukan dengan cara mengambil satu ose dari masing-masing kultur bakteri endofit untuk diinokulasikan di atas campuran suspensi jamur patogen dan medium PDA tadi. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk

jamur *C.albicans* dan 25°C untuk jamur *T.mentagrophytes*. Potensi isolat bakteri endofit untuk menghambat pertumbuhan jamur patogen ditandai dengan terbentuknya zona hambat disekeliling isolat bakteri endofit.

c. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri

Pembuatan kurva tumbuh bakteri ini dilakukan dengan metode turbidimetri dengan cara mengukur turbiditas atau kekeruhan dari sampel kultur bakteri menggunakan nilai *Optical Density* (OD). Pengukuran OD dilakukan menggunakan alat spektrofotometer. Sebanyak satu ose koloni bakteri diinokulasikan pada 10 ml medium LB cair dan diinkubasi selama 24 jam pada *waterbath shaker* pada suhu 37°C dengan kecepatan 121 rpm untuk diaktivasi. Setelah 24 jam, kultur bakteri dipindahkan ke dalam 90 ml medium LB cair yang telah disterilisasi. Kultur bakteri yang telah dipindahkan tersebut diukur turbiditasnya dengan panjang gelombang 600 nm (Ihsan, 2013) sebagai data untuk jam ke-0. Selanjutnya kultur bakteri diinkubasi kembali dalam *waterbath shaker* dengan kecepatan 121 rpm pada suhu 37°C. Turbiditas dari kultur bakteri diukur setiap satu jam selama ±24 jam pengamatan sampai fase stasioner dapat diketahui dengan jelas. Data yang bias dapat dihindari dengan melakukan pengukuran OD dari 3 erlenmeyer berisi kultur bakteri atau dengan kata lain menggunakan 3 kali pengulangan.

d. Pembuatan Kurva Tumbuh dan Kurva Baku *C.albicans*

Pembuatan kurva tumbuh ini dilakukan dengan metode turbidimetri. Pertama-tama jamur *C.albicans* disubkultur terlebih dahulu dalam medium agar miring PDA steril selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu sebanyak 10 ml NaCl 0,85% dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Kemudian satu ose *C.albicans* dimasukkan ke dalam tabung reaksi tersebut. Kekeruhan inokulum dibandingkan dengan 0,5 McFarland (komposisi larutan dapat dilihat pada Lampiran 2) yang setara dengan 5×10^6 CFU/ml. Inokulum yang telah siap diambil sebanyak 5 ml (5% dari medium inokulasi) dan diaktivasi ke dalam 100 ml medium PDB.

Aktivasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C dan di-*shaker* dengan kecepatan 121 rpm. Pengukuran kurva tumbuh *C.albicans* dapat dilakukan setelah inokulum dipindahkan ke 100 ml medium PDB baru yang telah steril. Pengukuran kurva tumbuh dilakukan selama 24 jam dengan cara mengukur turbiditas atau kekeruhan kultur jamur *C.albicans* menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm (Engriyani, 2011). Selanjutnya dibuat kurva tumbuh yang didasarkan pada hubungan nilai absorbansi (sumbu Y) dengan waktu (sumbu X). Setelah kurva tumbuh dibuat, maka dapat diketahui fase logaritmik dari *C.albicans*.

Pembuatan kurva baku *C.albicans* dilakukan berdasarkan metode Cappucino dan Sherman (2011) dan sesuai dengan pengukuran kurva tumbuh sebelumnya. Biakkan yang diambil ialah pada jam ke-8, 10, dan 12. Pengukuran kurva baku *C.albicans* dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 ml biakkan dan dilakukan pengenceran hingga 10^{-6} menggunakan akuades steril. Setelah itu dilakukan metode cawan tuang (*pour plate*) secara *duplo* dengan cara mengambil 1 ml biakkan pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} yang dimasukkan ke dalam cawan Petri steril dan ditambahkan 9 ml medium PDA cair steril. Medium dan biakkan dihomogenkan dengan cara memutar cawan Petri seperti angka 8. Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu jumlah koloni dihitung menggunakan *colony counter*.

e. Pembuatan Kurva Tumbuh *T.mentagrophytes*

Pengukuran kurva tumbuh jamur ini dilakukan dengan cara menghitung jumlah spora jamur setiap 24 jam. Pertama-tama jamur *T.mentagrophytes* disubkultur pada 10 buah tabung reaksi berisi medium agar miring PDA steril. Jamur diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 jam (Cappucino dan Sherman, 2011). Setelah itu sebanyak 10 ml larutan fisiologis (NaCl 0,85%) dimasukkan ke dalam biakkan jamur dan dihomogenkan dengan vortex (Alio *et al.*, 2005). Kemudian suspensi dipindahkan ke tabung reaksi steril lain. Suspensi diambil menggunakan

mikropipet dan diteteskan di atas *haematocytometer* untuk dihitung jumlah sporanya. Apabila jumlah spora terlalu banyak, maka dapat dilakukan pengenceran dengan cara mencampurkan 1 ml suspensi spora dengan 9 ml akuades steril dan menghomogenkannya dengan vorteks. Pengecekan jumlah spora dilakukan sampai diketahui fase logaritmik dari jamur.

f. Penyediaan Inokulum *C.albicans*

Sebanyak satu ose jamur *C.albicans* yang berumur 2 x 24 jam dimasukkan ke dalam 50 ml medium PDB steril. Jamur dikultur pada suhu 37°C menggunakan *waterbath shaker* dengan kecepatan 121 rpm. Biakkan jamur ditumbuhkan hingga mencapai fase logaritmik (12 jam) sesuai dengan hasil pengukuran kurva tumbuh dan kurva baku. Inokulum jamur yang telah berumur 12 jam kemudian dipanen sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam tabung mikro steril untuk kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet yang didapatkan kemudian dicuci menggunakan larutan 0,85% NaCl steril dengan cara disentrifugasi kembali sebanyak dua kali. Pelet yang telah dicuci kemudian disuspensikan dalam 0,85% NaCl steril dan kekeruhannya disesuaikan dengan standar 0,5 Mc.Farland. Standar 0,5 Mc.Farland setara dengan $1\sim 5 \times 10^6$ sel/ml.

g. Penyediaan Inokulum *T.mentagrophytes*

Metode ini dilakukan berdasarkan penelitian Agarwal *et al.* (2015) dengan modifikasi. Pada tahap ini jamur *T.mentagrophytes* ditumbuhkan terlebih dahulu selama 6 hari pada medium PDA. Setelah itu sebanyak 1 ml larutan NaCl 0,85% steril dimasukkan ke dalam biakkan dan divorteks selama 15 detik. Suspensi inokulum kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dan diencerkan dalam (1:10) akuades steril. Kekeruhan inokulum disesuaikan dengan transmittan 70-72% (Santos dan Hamdan, 2005) atau setara dengan nilai absorbansi 1,845 - 1,857 pada panjang gelombang 520 nm.

h. Pengumpulan Supernatan (Metabolit Sekunder) Isolat Bakteri Endofit

Pengumpulan supernatan sebagai perlakuan pada uji aktivitas antifungi dilakukan berdasarkan metode Tanuwijaya (2015) dengan modifikasi. Tujuh isolat bakteri endofit (M, O, H, I13, I14, B14, dan B15) ditumbuhkan dalam medium LB agar selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu sebanyak satu ose dari masing-masing isolat bakteri endofit dimasukkan ke dalam 10 ml medium LB cair steril yang sudah hangat kuku dan diinkubasi dalam *waterbath shaker* hingga mencapai fase stasioner (sesuai dengan hasil pengukuran kurva tumbuh). Kultur yang telah dipanen kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan supernatnya. Setelah itu supernatan dikumpulkan dalam tabung reaksi steril dan diukur volumenya. Pelet yang dihasilkan dari hasil sentrifugasi pun ditimbang menggunakan timbangan analitik. Sehingga konsentrasi berat sel dalam medium dapat diketahui. Selanjutnya supernatan disimpan dalam suhu 4°C agar tidak cepat rusak.

i. Uji Aktivitas Antifungi Supernatan Isolat Bakteri Endofit

Supernatan dari masing-masing isolat bakteri endofit digunakan sebagai sampel perlakuan untuk jamur *C.albicans* dan *T.mentagrophytes*. Pengulangan dari setiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali dengan kontrol negatif menggunakan akuades steril (Miranti *et al.*, 2013) dan kontrol positif menggunakan nystatin 100.000 ppm untuk jamur *C.albicans* (Goodman, 2014) dan ketokonazol 10.000 ppm untuk jamur *T.mentagrophytes* (Warsito *et al.*, t.t.). Konsentrasi dari masing-masing supernatan juga diatur menjadi 10 mg/ml dan 20 mg/ml. Sebanyak 200µl inokulum dari masing-masing jamur patogen dimasukkan ke dalam cawan Petri steril yang berisi 9 ml medium PDA steril yang telah memadat. Inokulum jamur kemudian diratakan menggunakan batang L steril. Masing-masing supernatan disiapkan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Kemudian kertas cakram steril direndam dalam 100µl supernatan (Warsito *et al.*, t.t.) selama 2 menit. Setelah itu kertas cakram diletakkan di atas medium yang telah berisi biakkan jamur dan diinkubasi

selama 24-48 jam pada suhu 37°C (untuk jamur *C.albicans*) dan 25°C (untuk jamur *T.mentagrophytes*). Zona hambat yang terbentuk kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

j. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan program SPSS 16.0 *for windows*. Data yang dianalisis ialah data hasil pengukuran kurva baku *C.albicans* dan data hasil pengukuran rata-rata diameter zona hambat dari uji aktivitas antifungi. Jenis analisis data yang dilakukan diantaranya:

1) Analisis Regresi Linier

Pada analisis data kurva tumbuh dan kurva baku *C.albicans*, digunakan analisis regresi pada program SPSS untuk mengetahui koefisien regresi pada persamaan yang akan digunakan dalam perhitungan jumlah koloni dan laju pertumbuhan jamur. Analisis regresi juga menghasikan diagram sebaran jumlah koloni jamur pada jam-jam tertentu.

2) Uji Normalitas

Uji normalitas masing-masing dilakukan pada kelompok perlakuan terhadap *C.albicans* dan kelompok perlakuan terhadap *T.mentagrophytes*. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui sebaran data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik.

3) Uji Homogenitas

Uji homogenitas masing-masing dilakukan pada kelompok perlakuan terhadap *C.albicans* dan kelompok perlakuan terhadap *T.mentagrophytes*. Variansi data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik dapat diketahui. Uji statistik parametrik dapat dilakukan apabila sebaran data normal dan homogen. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka dilakukan uji statistik non-parametrik.

4) Uji Lanjut *Least Significant Difference* (LSD)

Kelompok data pada perlakuan terhadap *C.albicans* memiliki sebaran yang normal dan homogen. Sehingga dapat dilakukan uji

statistik parametrik dengan uji LSD untuk mengetahui perbedaan rata-rata diameter zona hambat dari setiap perlakuan.

5) Uji *Mann-Whitney U*

Kelompok data perlakuan terhadap *T.mentagrophytes* menunjukkan bahwa sebaran data tidak normal dan tidak homogen. Maka dari itu dilakukan uji statistik non-parametrik, yakni uji *Mann-Whitney U* untuk mengetahui perbedaan rata-rata diameter zona hambat dari setiap perlakuan.

Berdasarkan data diameter zona hambat, dapat diketahui tingkat aktivitas penghambatan dari masing-masing isolat bakteri endofit terhadap jamur *C.albicans* dan *T.mentagrophytes*. Hal tersebut mengacu pada kriteria di bawah ini.

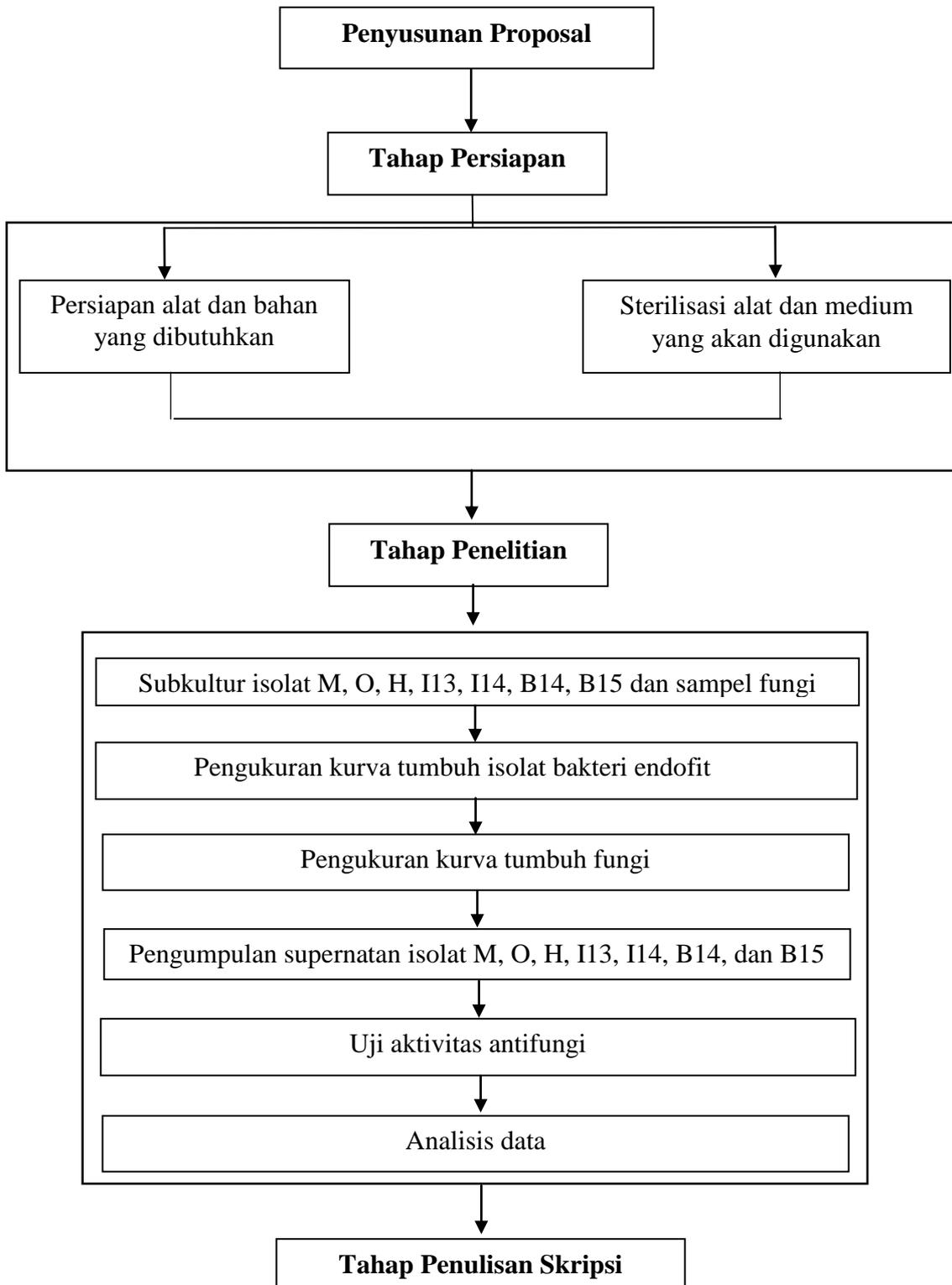
Tabel 3.1 Kategori Tingkat Aktivitas Penghambatan

Diameter zona hambat	Tingkat penghambatan
7 – 15 mm	Lemah
16 – 25 mm	Sedang
> 25 mm	Kuat

(Sumber: Nedialkova dan Naidenova, 2004)

F. Alur Penelitian

Alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian