

## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2005). Penelitian eksperimen juga dapat didefinisikan sebagai penelitian dimana peneliti melakukan uji coba atau pengamatan khusus untuk membuktikan sesuatu yang bersifat meragukan dalam kondisi yang ditentukan oleh peneliti (Nindhia, 2013). Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana setiap perlakuan dalam percobaan dirancang dengan kondisi yang relatif homogen (Nindhia, 2013). Objek dari penelitian ini merupakan pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes* dengan perlakuan pemberian supernatan isolat bakteri endofit O (Permatasari, 2011) yang berasal dari akar tanaman *Vetiveria zizanioides* dan supernatan isolat bakteri endofit I13, I14, B14 dan B15 (Fauziah, 2012) yang berasal dari akar tanaman *Ageratum conyzoides* dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Kelima isolat bakteri endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi pada penelitian sebelumnya. Variabel bebas dalam penelitian ini ialah jenis dan konsentrasi supernatan isolat bakteri endofit. Variabel terikat dalam penelitian ini ialah kondisi inkubasi (suhu, waktu), medium yang digunakan, konsentrasi inokulum jamur uji, serta faktor pengenceran supernatan dan inokulum jamur uji.

Penelitian ini diawali dengan proses subkultur bakteri endofit isolat O, I13, I14, B14 dan B15 yang berasal dari *cryopreservation* ke dalam medium Luria Bertani (LB) agar. Kelima isolat bakteri endofit ini kemudian ditumbuhkan pada medium Luria Bertani (LB) cair hingga mencapai fase stationer. Penentuan waktu fase stationer masing-masing isolat didasarkan pada kurva tumbuh yang sudah dibuat pada penelitian sebelumnya (Pratiwi, 2013; Ihsan, 2013; Masita, 2016). Setelah mencapai waktu panen, kultur bakteri endofit

yang ditumbuhkan pada medium Luria Bertani (LB) cair disentrifugasi dengan tujuan memisahkan supernatan dari sel bakteri. Supernatan diambil sebagai hasil metabolisme sekunder bakteri yang di dalamnya diduga terdapat anti mikroba sebagai bentuk pertahanan bakteri. Supernatan yang didapatkan dari hasil sentrifugasi ini kemudian diencerkan menggunakan akuades steril hingga mencapai konsentrasi 80%, 60%, 40%, dan 20%.

Setelah supernatan bakteri endofit didapatkan, dilakukan pengujian aktivitas anti jamur terhadap *T. mentagrophytes* dengan metode *Broth Microdilution* menggunakan *microplate*. Setiap perlakuan dilakukan dengan beberapa pengulangan yang didasarkan pada perhitungan Federer (1977) di bawah ini:

$(T - 1)(n - 1) \geq 15$	Keterangan :
$(7 - 1)(n - 1) \geq 15$	n = jumlah replikasi
$6(n - 1) \geq 15$	T = jumlah perlakuan
$6n - 6 \geq 15$	
$6n \geq 15 + 6$	
$6n \geq 21$	
$n \geq 3.5 \sim 4$	

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan pengulangan dari setiap perlakuan adalah 4 seri. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah jumlah spora *T. mentagrophytes* setelah diberikan perlakuan pemberian supernatan isolat bakteri endofit O, I13, I14, B14 dan B15 dengan menggunakan teknik *spore counting* pada *Nebauer counting chamber* atau *hemocytometer*. Data jumlah spora yang telah didapatkan dari setiap konsentrasi perlakuan kemudian diolah dengan menggunakan aplikasi SPSS 16.0 *for windows*.

## B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini ialah isolat bakteri endofit dari akar tanaman *A. conyzoides* dan *V. zizanioides*. Sedangkan sampel yang

digunakan dalam penelitian ini adalah 5 (lima) isolat bakteri endofit yakni isolat O yang berasal dari akar tanaman *V. zizanioides* (Permatasari, 2011) serta isolat I13, I14, B14, dan B15 yang berasal dari akar tanaman *A. conyzoides* (Fauziah, 2012). Kelima isolat bakteri endofit tersebut didapatkan dari penelitian sebelumnya.

### **C. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian mulai dilaksanakan dari bulan Januari hingga September 2017. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

### **D. Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. 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 yang akan digunakan dicuci dan dibersihkan terlebih dahulu. Alat-alat kemudian 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. Bahan-bahan seperti larutan dan medium yang akan digunakan juga disterilisasi dalam autoklaf pada keadaan yang sama.

## 2. Tahap Penelitian

### a. Subkultur Isolat Bakteri Endofit

Sebanyak 5 (lima) isolat bakteri endofit dari penelitian sebelumnya yang telah diawetkan dengan metode *cryopreservation* disiapkan. Kelima isolat bakteri endofit tersebut diantaranya isolat O (*Pseudomonas aeruginosa*), I13 (*Pantoea* sp.), I14 (*Klebsiella pneumonia*), B14 (*Staphylococcus equorum*), dan B15 (*Staphylococcus* sp.) ditumbuhkan kembali atau disubkultur ke dalam medium agar miring. Subkultur kelima isolat bakteri endofit dilakukan pada *laminar air flow* dengan alat dan bahan yang telah disterilkan. Medium yang digunakan ialah medium Luria Bertani (LB) agar steril. Komposisi medium LB agar dapat dilihat pada Lampiran 2. Setiap biakan murni isolat bakteri endofit kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan setelah itu dipindahkan ke dalam kulkas dengan suhu 4°C supaya tahan lama dan tidak terkontaminasi oleh mikroba lain. Isolat bakteri endofit ini dijadikan sebagai stok dan disubkultur kembali pada medium agar miring ketika akan dilakukan uji aktivitas anti jamur.

### b. Penyediaan Inokulum *Trichophyton mentagrophytes*

Pada tahap penyediaan inokulum ini, jamur *T. mentagrophytes* ditumbuhkan terlebih dahulu selama 6 (enam) hari pada medium agar miring (Agarwal *et al.*, 2015). Medium yang digunakan ialah medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) agar steril yang komposisinya dapat dilihat pada Lampiran 2. Tahap selanjutnya yaitu penyediaan suspensi inokulum dilakukan berdasarkan penelitian Santos *et al.* (2006) dan Barros *et al.* (2007) dengan modifikasi. Sebanyak 5 ml larutan NaCl 0,85% steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi biakan jamur *T. mentagrophytes* yang sebelumnya telah ditumbuhkan pada medium PDA selama 6 (enam) hari. Permukaan biakan dikeruk dengan menggunakan lup inokulasi steril kemudian tabung reaksi yang

telah berisi biakan dan larutan NaCl 0,85% divorteks selama 15 detik. Konidia dan fragmen hifa yang telah tercampur di dalam larutan NaCl 0,85% selanjutnya disaring menggunakan kertas saring steril (Whatman no. 1) dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril. Prosedur ini menghilangkan mayoritas fragmen hifa dan memproduksi suspensi inokulum yang mayoritas terdiri dari spora. Konsentrasi final inokulum disesuaikan hingga mencapai  $0,5 \times 10^6$ - $5,0 \times 10^6$  spora ml<sup>-1</sup>.

c. Pengumpulan Supernatan (Metabolit Sekunder) Isolat Bakteri Endofit

Pengumpulan supernatan isolat bakteri endofit sebagai perlakuan pada uji aktivitas anti jamur dilakukan berdasarkan metode Tanuwijaya (2015) dengan modifikasi. Kelima isolat bakteri endofit (O, I13, I14, B14, dan B15) ditumbuhkan dalam medium Luria Bertani (LB) agar miring steril dan diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu sebanyak 1 (satu) ose dari masing-masing isolat bakteri endofit diinokulasikan ke dalam 10 ml medium Luria Bertani (LB) cair steril yang sudah hangat kuku dan diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 37°C hingga mencapai fase stasioner (sesuai dengan hasil pengukuran kurva tumbuh, dapat dilihat pada Tabel 3.1). Kultur isolat bakteri endofit yang telah dipanen kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro steril dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan supernatan dari sel bakteri dan debris. Setelah itu supernatan diencerkan dengan menggunakan akuades steril sehingga didapatkan konsentrasi supernatan 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Selanjutnya supernatan disimpan dalam suhu 4°C agar tidak cepat rusak.

Tabel 3.1 Waktu Stationer Isolat Bakteri Endofit

No	Nama spesies bakteri	Kode isolat	Waktu stasioner (jam ke-)	Waktu panen (jam ke-)
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	O	20, 21, 22	21
2	<i>Pantoea</i> sp.	I13	12, 13, 14, 15	14
3	<i>Klebsiella pneumonia</i>	I14	12, 14, 16	16
4	<i>Staphylococcus equorum</i>	B14	13, 15, 17	15
5	<i>Staphylococcus</i> sp.	B15	16, 17, 18	16

Keterangan: Waktu stasioner isolat bakteri endofit didapatkan dari penelitian

Pratiwi (2013), Ihsan (2013), dan Masita (2016).

d. Uji Aktivitas Anti Jamur Supernatan Isolat Bakteri Endofit dengan Metode *Broth Microdilution*

Uji aktivitas anti jamur dengan metode *Broth Microdilution* dilakukan menggunakan *96-well microtitration plate*. Supernatan dari masing-masing isolat bakteri endofit digunakan sebagai sampel perlakuan untuk jamur *T. mentagrophytes*. Pengulangan dari setiap perlakuan dilakukan sebanyak 4 (empat) kali sesuai dengan perhitungan Federer (1977) yang telah dicantumkan di atas. Metode uji aktivitas anti jamur *Broth Microdilution* ini diadaptasi dari penelitian Balouiri *et al.* (2016) sesuai dengan rekomendasi dari protokol *The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* dan *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, serta penelitian Barros *et al.* (2007) dengan modifikasi.

Pertama-tama, supernatan isolat bakteri endofit dengan konsentrasi yang telah disesuaikan (20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%) diencerkan dalam medium *Potato Dextrose Broth (PDB)* steril dengan perbandingan 1/10 (v/v). Kemudian sebanyak 100 µl supernatan yang telah diencerkan dalam medium PDB dimasukkan ke dalam masing-masing *well* nomor 3-7 mulai dari konsentrasi rendah hingga tinggi, lalu untuk pengulangan supernatan dimasukkan ke dalam masing-masing *well* nomor 8-12 mulai dari konsentrasi tinggi hingga rendah. *Well* nomor 1 diisi sebanyak 200 µl medium PDB sebagai kontrol

positif, sementara *well* nomor 2 diisi sebanyak 100  $\mu\text{l}$  medium PDB sebagai kontrol negatif. Selanjutnya suspensi inokulum jamur *T. mentagrophytes* yang telah disiapkan diencerkan dalam medium PDB dengan perbandingan 1/100 (v/v) sehingga menghasilkan konsentrasi akhir inokulum sebesar  $0,5 \times 10^4$ - $5,0 \times 10^4$  spora  $\text{ml}^{-1}$ . Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  inokulum yang telah diencerkan dalam medium PDB kemudian dimasukkan ke dalam *well* nomor 2-12. Setelah itu *microplate* ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

Setelah diinkubasi selama 24 jam, spora jamur *T. mentagrophytes* yang telah diberi perlakuan dengan supernatan isolat bakteri endofit dari berbagai konsentrasi menggunakan metode *Broth Microdilution* dihitung. Jumlah spora jamur *T. mentagrophytes* dihitung secara manual menggunakan Nebauer *counting chamber* atau *hemocytometer* dan mikroskop.

e. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan program SPSS 16.0 *for windows*. Data yang dianalisis ialah data hasil pengukuran rata-rata jumlah spora dari uji aktivitas anti jamur. Jenis analisis data yang dilakukan diantaranya:

1) Uji Normalitas

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

2) Uji Homogenitas

Uji homogenitas masing-masing dilakukan pada 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.

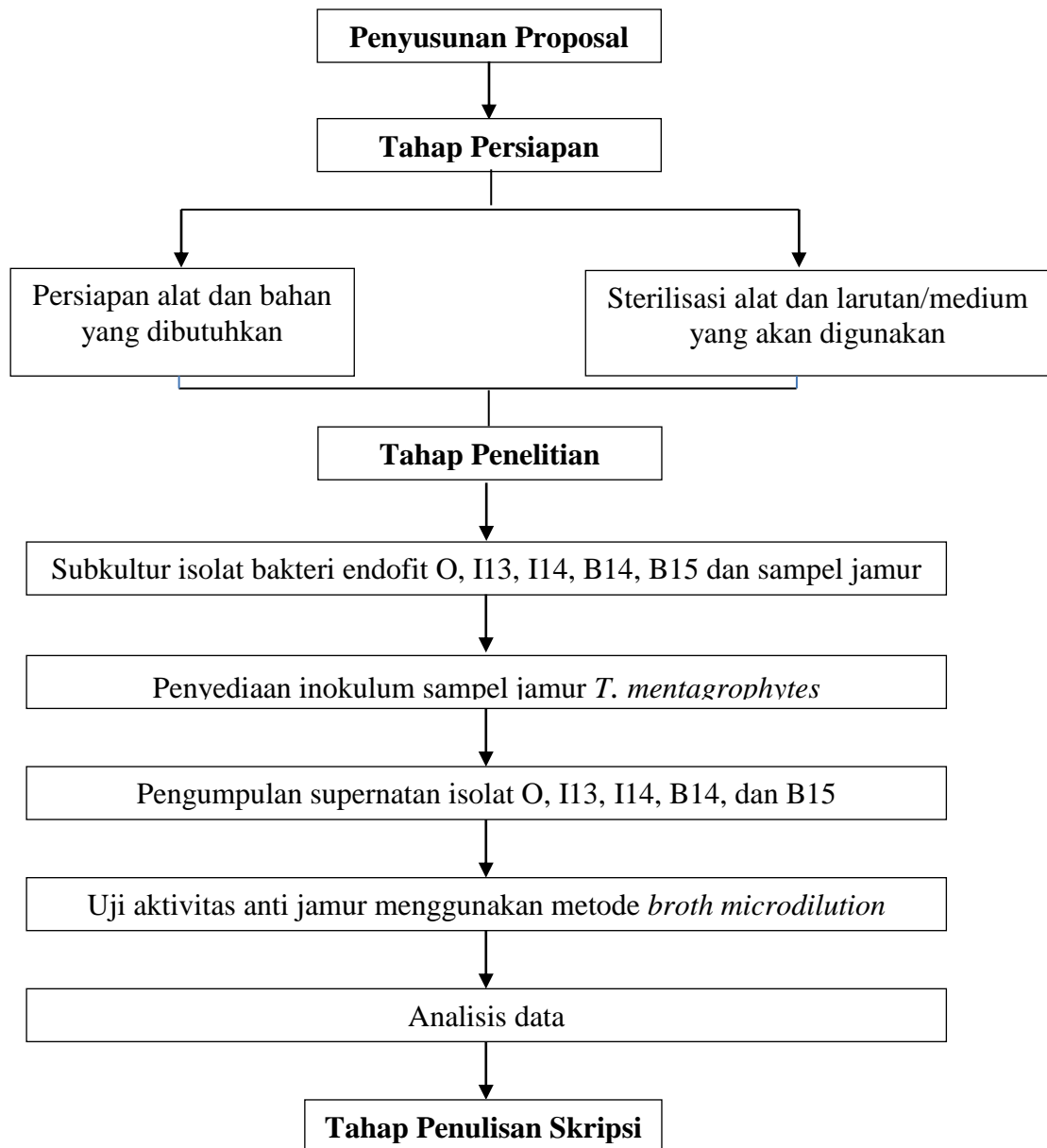
3) Uji *Mann-Whitney U*

Kelompok data perlakuan terhadap *T. mentagrophytes* menunjukkan bahwa sebaran data tidak normal dan tidak homogen. Maka dari itu dilakukan uji statisti non-parametrik, yaitu uji *Mann-Whitney U* untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah spora dari setiap perlakuan.



## F. Alur Penelitian

Alur dari penelitian Aktivitas Anti Jamur Isolat Bakteri Endofit Akar *Ageratum conyzoides* dan *Vetiveria zizanioides* terhadap *Trichophyton mentagrophytes* dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian