

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2005). Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana setiap perlakuan dalam perobaan dirancang dengan kondisi yang relatif homogen (Nindhia, 2013). Objek dari penelitian ini merupakan pertumbuhan khamir *Candida albicans* dengan perlakuan pemberian supernatan isolat bakteri endofit I13, I14, B14 dan B15 (Fauziah, 2012) yang berasal dari akar *Ageratum conyzoides* dan supernatan isolat bakteri endofit O (Permatasari, 2011) yang berasal dari akar *Vetiveria zizanioides* dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100 % (v/v). Penelitian ini diawali dengan proses subkultur bakteri endofit isolat O, I13, I14, B14 dan B15 yang berasal dari *cryo preservation*. Isolat ini kemudian ditumbuhkan pada medium Luria-Bertani cair hingga pada fase stationer. Penentuan waktu fase stationer masing-masing isolat didasarkan pada kurva tumbuh yang sudah dibuat pada penelitian sebelumnya (Masita, 2016). Supernatan diambil sebagai hasil metabolisme sekunder bakteri yang didalamnya terdapat antimikroba sebagai bentuk pertahanan bakteri. Kemudian, supernatan hasil sentrifugasi ini diencerkan hingga mencapai konsentrasi 80%, 60%, 40%, dan 20%.

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

$$\begin{aligned}(T - 1)(n - 1) &\geq 15 \\ (7 - 1)(n - 1) &\geq 15 \\ 6(n - 1) &\geq 15 \\ 6n - 6 &\geq 15\end{aligned}$$

Keterangan :
n = jumlah replikasi
T = jumlah perlakuan

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3.5 \sim 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan pengulangan dari setiap perlakuan adalah 4 seri. Parameter yang perlu diukur adalah jumlah sel *C. albicans* setelah diberikan perlakuan pemberian supernatan isolat bakteri endofit O, I13, I14, B14 dan B15 dengan menggunakan teknik turbidimetri. *Optical density* dari setiap konsentrasi kemudian akan dikonversi ke dalam jumlah koloni melalui kurva baku dan diolah dengan menggunakan aplikasi SPSS 17.0 *for windows*.

B. Populasi Sampel

Populasi dan sampel yang akan dianalisis pada penelitian ini ialah supernatan dari isolat bakteri endofit O yang diisolasi dari akar tanaman *A. conyzoides* yang sudah diidentifikasi secara uji biokimia dan molekuler (Permatasari, 2011) sebagai *Pseudomonas aeruginosa* dan supernatan dari isolat bakteri endofit B14, B15, I13 serta I14 yang diisolasi dari akar tanaman *V. zizanioides* yang telah diidentifikasi secara uji biokimia (Fauziah, 2012) dan molekuler (Rosica, 2015) berturut-turut sebagai *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus sp.* *Pantoea sp.* dan *Klebsiella pneumoniae*. Sementara itu sampel yang akan dijadikan parameter ialah sel khamir *C. albicans* ATCC 10231 yang bersifat patogen terhadap manusia.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian mulai dilaksanakan dari bulan Mei hingga September 2017 di Laboratorium Riset Bioteknologi B307, Departemen Pendidikan Biologi, Gedung Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam B, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

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. Langkah Kerja

a. Tahap Persiapan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan. Selanjutnya, alat-alat yang sudah disiapkan dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas untuk disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C. Selain alat yang digunakan, medium tumbuh seperti Luria-Bertani (LB agar dan LB broth), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), dan agar Mueller-Hinton juga ikut disterilisasi.

b. Tahap Penelitian

1. Subkultur Isolat Bakteri dan Sampel Khamir

Isolat bakteri endofit O, I13, I14, B14 dan B15 ditumbuhkan kembali dari *cryo preservation*. Kelima isolat ditumbuhkan pada cawan dengan medium agar Luria-Bertani. Setelah dua kali proses subkultur, kelima isolat ditumbuhkan pada agar Luria-Bertani miring. Hal ini dilakukan untuk menjaga kemurnian isolat bakteri endofit yang didapat dari *cryo preservation*. Biakan bakteri endofit ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Adapun komposisi dari medium Luria-Bertani dapat dilihat pada lampiran.

Sampel *C. albicans* ATCC 10231 didapatkan dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung. Biakan *C. albicans* disubkultur pada cawan dengan medium agar Mueller-Hinton dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C.

2. Pengumpulan Supernatan (Metabolit Sekunder) Bakteri Endofit

Pengumpulan supernatan yang diasumsikan sebagai metabolit sekunder bakteri endofit dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Beric pada tahun 2012 dengan beberapa modifikasi. Kelima isolat bakteri endofit dikultur pada agar Luria-Bertani selama 2

× 24 jam yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah itu, satu ose masing-masing biakan bakteri endofit diinokulasikan ke dalam 10 mL medium LB cair. Kemudian, biakan cair ini diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 37°C, hingga masing-masing isolat mencapai fase stationernya. Adapun penentuan waktu stationer masing-masing isolat didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Masita (2016), Pratiwi (2013) dan Ihsan (2013). Waktu panen masing-masing isolat dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Waktu Stasioner 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 sp.</i>	I13	12, 13, 14, 15	14
3	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	I14	12, 14, 16	16
4	<i>Staphylococcus equorum</i>	B14	13, 15, 17	15
5	<i>Staphylococcus sp.</i>	B15	16, 17, 18	16

Setelah mencapai fase stationer, kultur bakteri endofit ini disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan bakteri endofit dipisahkan dari peletnya, yang kemudian diujikan dengan metode *Broth Microdilution*.

3. Penyediaan Inokulum *C. albicans*

Penyediaan inokulum *C. albicans* dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Irfan, dkk. (2017) dengan modifikasi. *C. albicans* ditumbuhkan pada cawan dengan medium *Potato Dextrose Agar* selama 2 × 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu diambil tiga koloni dengan diameter satu milimeter dengan menggunakan ose, kemudian

diinokulasikan pada erlenmeyer 100 mL yang berisikan 15 mL medium *Potato Dextrose Broth*. Inokulum kemudian diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C hingga mencapai fase log (eksponensial), yakni pada jam ke 12. Adapun penentuan waktu fase log inokulum *C. albicans* didapatkan dari penelitian yang dilakukan oleh Masita (2016). Kultur *C. albicans* ini kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan sel khamir *C. albicans*. Pelet hasil sentrifugasi dibilas dengan NaCl sebanyak dua kali. Sebanyak 200 µL suspensi dilarutkan dalam 3 mL NaCl steril. Kemudian divortex selama 15 detik dan dicek agar memenuhi 0,5 *standard McFarland* pada panjang gelombang 530 nm. Penyetaraan suspensi sel dengan 0,5 *standard McFarland* dilakukan dengan penambahan suspensi atau pengenceran dengan menggunakan NaCl. Prosedur ini digunakan untuk memenuhi 1×10^6 hingga 5×10^6 sel.

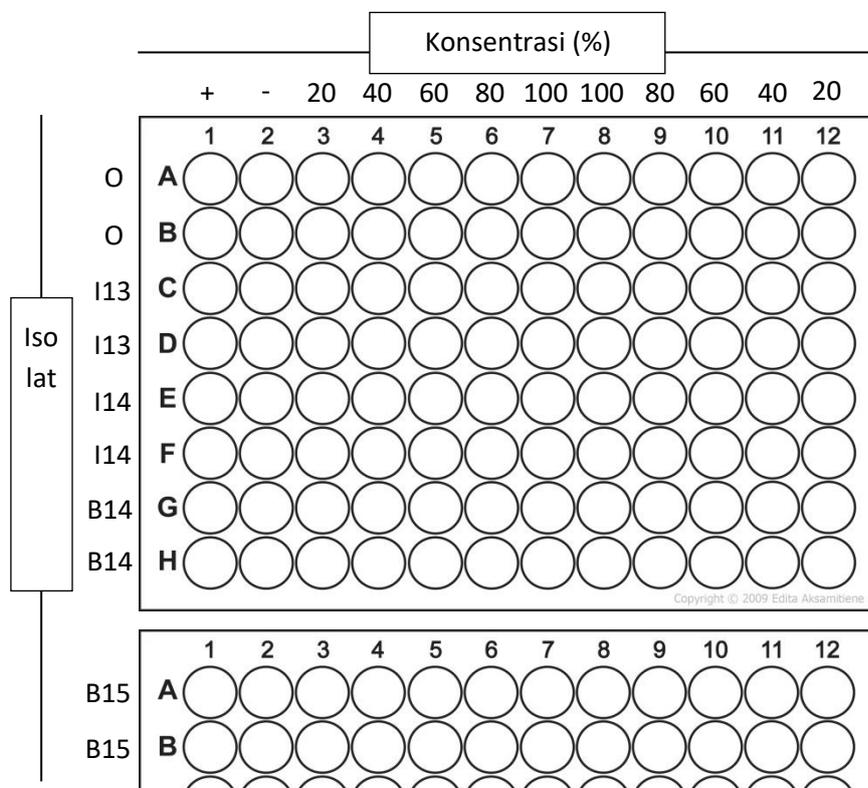
4. Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku dibuat untuk mengetahui perkiraan jumlah koloni pada suspensi sel *C. albicans* hasil dari *Broth Microdilution Assay*. Kurva baku ini dilakukan berdasarkan petunjuk Cappucino dan Sherman (2011) dengan modifikasi. *C. albicans* ditumbuhkan pada 20 mL medium *Potato Dextrose Broth* di dalam erlenmeyer 100 mL. Kemudian diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C.

Pada jam ke 6, 8 dan 10, sebanyak 1 mL inokulum diambil untuk kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan blanko berupa medium PDB steril, pada saat yang bersamaan 1 mL inokulum juga ditambahkan pada 9 mL

akuades steril. Sebanyak 1 mL akuades steril pada pengenceran pertama ditambahkan pada 9 mL akuades steril pengenceran kedua, dan seterusnya hingga pada pengenceran ke enam. Satu mililiter inokulum dari pengenceran ke enam diambil untuk kemudian dituangkan pada cawan petri steril. Setelah itu ditambahkan 9 mL medium *Potato Dextrose Agar* yang kemudian dihomogenkan. Biakan *C. albicans* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, koloni *C. albicans* dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Data dari hasil absorbansi dan jumlah koloni yang tumbuh pada medium PDA kemudian diolah dengan menggunakan *SPSS 17.0 for windows* sehingga dihasilkan kurva baku *C. albicans*.

5. Broth Microdilution Assay



Gambar 3.1 Skema Penempatan Perlakuan Supernatan Kelima Isolat Bakteri Endofit Pada *Microplate*

Metode *Broth Microdilution* dilakukan sesuai dengan prosedur yang dipaparkan oleh Balouiri (2016). Inokulum *C. albicans* yang sudah dipersiapkan sebelumnya diencerkan dengan medium PDB sebanyak 1 : 150, didapatkan dengan menambahkan 10 μL inokulum pada 1490 μL medium PDB. Supernatan dari masing-masing isolat bakteri endofit diencerkan dengan menggunakan akuades steril hingga memenuhi konsentrasi 80%, 60%, 40% dan 20% (v/v). Kemudian masing-masing konsentrasi supernatan bakteri diencerkan kembali sebanyak 1 : 10, didapatkan dengan menambahkan 100 μL supernatan bakteri ke dalam 900 μL medium PDB. Masing-masing *well* pada 96-*well microplate* berisikan 100 μL supernatan, 50 μL inokulum *C. albicans*, dan 50 μL medium PDB. Kontrol positif hanya berisikan 200 μL medium PDB, sedangkan untuk kontrol negatif hanya berisikan inokulum *C. albicans* dan medium PDB. Adapun penempatan masing-masing perlakuan supernatan isolat bakteri endofit dapat dilihat pada gambar 3.1. Setelah itu *microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

6. Enumerasi Sel *C. albicans* dengan Teknik Turbidimetri

Turbidimetri merupakan salah satu tehnik penghitungan populasi mikroorganisme secara tidak langsung. Adapun absorbansi yang didapat dari prosedur spektrofotometri dapat dihubungkan dengan jumlah sel melalui pembuatan kurva baku *C. albicans* yang sudah dibuat sebelumnya. Suspensi masing-masing konsentrasi dari kelima isolat bakteri endofit pada *microplate* diambil sebanyak 100 μL untuk kemudian ditambahkan 900 μL akuades steril. Kemudian diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan blanko berupa campuran dari 900 μL akuades steril dengan 100 μL medium PDB steril. Absorbansi diukur pada panjang

gelombang 530 nm (Talebi, 2014). Selanjutnya nilai absorbansi ini dikonversi menjadi jumlah koloni melalui persamaan yang didapatkan dari kurva baku.

F. Analisis Data

Setelah mendapatkan data hasil penelitian, dilakukan analisis data dengan bantuan program *SPSS 17.0 for windows*. Pengolahan statistika ini dilakukan untuk memudahkan dalam interpretasi data hasil penelitian. Adapun uji statistika yang dilakukan adalah sebagai berikut,

1) Uji Normalitas

Uji Normalitas digunakan untuk mengetahui sebaran data yang didapat. Sebaran data dapat berupa terdistribusi normal atau tidak normal. Jumlah data yang didapat tidak >30 , maka digunakan uji normalitas Kolmogrov-Smirnov.

2) Uji Homogenitas

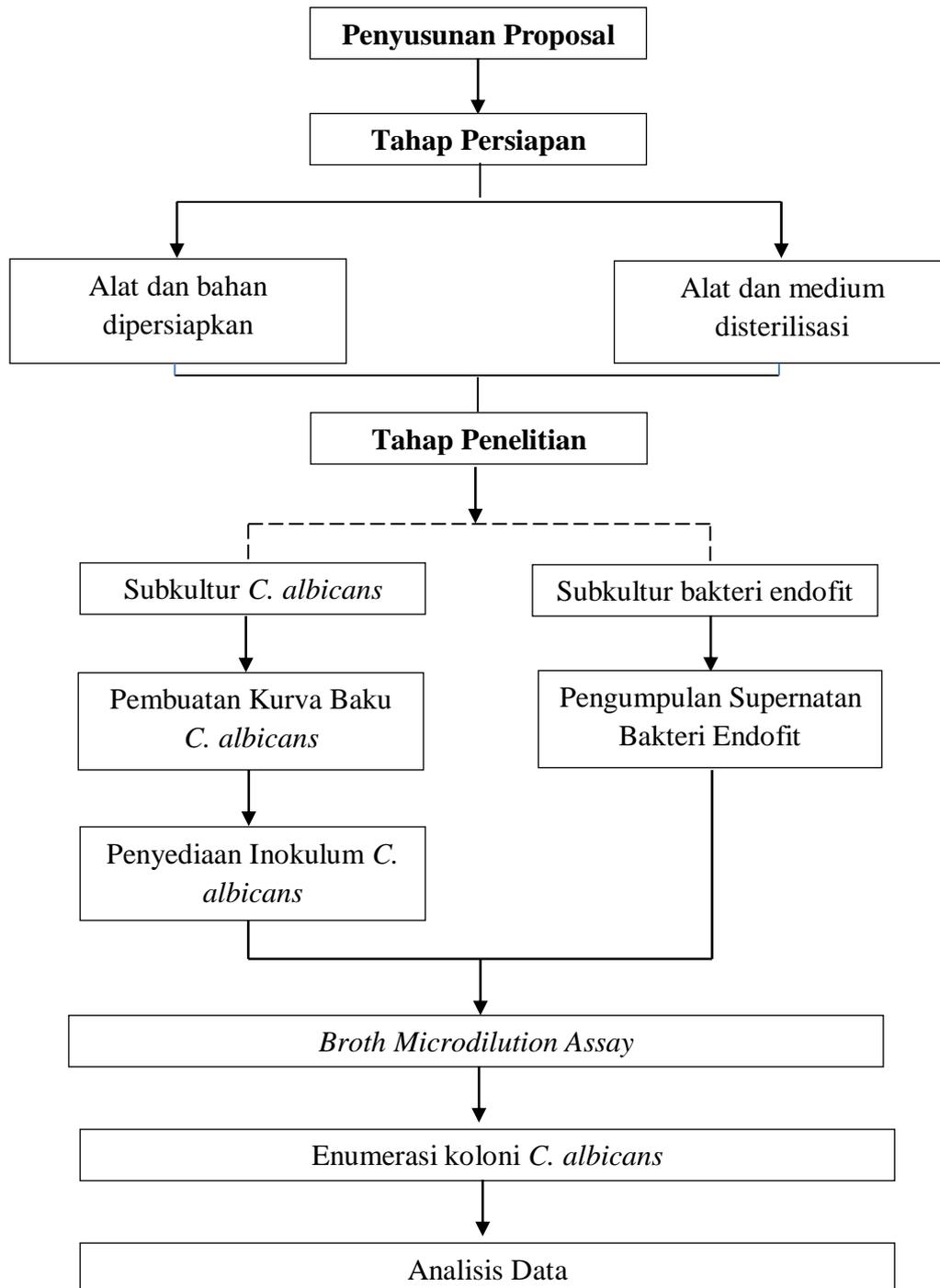
Uji homogenitas dilakukan sebagai syarat untuk melakukan uji statistik parametris. Syarat uji parametris adalah sebaran data terdistribusi normal dan homogen. Maka jika salah satunya tidak terpenuhi, dapat dilakukan uji non parametris. Uji homogenitas yang digunakan adalah uji Levene.

3) Uji Duncan

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan data memiliki sebaran terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji lanjut *Duncan* untuk mengetahui perbedaan rata-rata dari masing-masing isolat.

G. Alur Penelitian

Alur dari penelitian Potensi Anti Jamur Isolat Bakteri Endofit Akar *V. zizanioides* dan *A. conyzoides* terhadap *C. albicans* dapat dilihat pada Bagan 1.



Keterangan : --- = dilakukan secara paralel

Gambar 3.2 Bagan Alur Penelitian

Rahmawati, 2017

POTENSI ANTI JAMUR ISOLAT BAKTERI ENDOFIT AKAR VETIVERIA ZIZANIOIDES DAN AGERATUM CONYZOIDES TERHADAP CANDIDA ALBICANS

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Rahmawati, 2017

*POTENSI ANTI JAMUR ISOLAT BAKTERI ENDOFIT AKAR VETIVERIA ZIZANIOIDES DAN AGERATUM
CONYZOIDES TERHADAP CANDIDA ALBICANS*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu