

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian eksperimental yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi yang bertujuan untuk mengetahui akibat manipulasi terhadap perilaku individu yang diamati. 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).

B. Desain Penelitian

Desain dari penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana setiap perlakuan dalam perobaan dirancang dengan kondisi yang relatif homogen (Nindhia, 2013). Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* sebagai objek yang diberi perlakuan oleh supernatan dari tujuh isolat bakteri endofit (M, O, H) dari akar tanaman *Ageratum conyzoides* L. dan (I13, I14, B14, B15) dari akar tanaman *Vetiveria zizanioides* L. Isolat bakteri endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari penelitian sebelumnya. Variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas :

- a. Isolat bakteri endofit : *Acinetobacter* sp. (isolat M), *Pseudomonas aeruginosa* (isolat O), *Pantoea* sp. (isolat H), *Pantoea* sp. (isolat I13), *Klebsiella pneumonia* (isolat I14), *Staphylococcus equorum* (isolat B14), dan *Staphylococcus* sp. (isolat B15).
- b. Konsentrasi supernatan isolat bakteri endofit dengan variasi konsentrasi yaitu: 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

2. Variabel terikat : pertumbuhan bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus*; dengan parameter ukuran diameter zona hambat pada uji aktivitas antibakteri metode difusi, dan kekeruhan suspensi pada uji aktivitas antibakteri metode dilusi.

Banyaknya minimal pengulangan yang dilakukan diperoleh rumus dari Gomez dan Gomez (1995), yaitu :

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

$$49(r-1) \geq 20$$

$$49r - 49 \geq 20$$

$$35r \geq 69$$

$$r \geq 1,41$$

Keterangan :

r : jumlah pengulangan

t : jumlah perlakuan

20 : derajat bebas untuk RAL

Berdasarkan perhitungan tersebut, jumlah minimal pengulangan pada setiap perlakuan adalah 2 kali. Namun peneliti melakukan 3 kali pengulangan agar mendapatkan hasil yang lebih akurat.

Tabel 3.1 Rancangan Percobaan Penelitian

Perlakuan	M	H	O	I13	I14	B14	B15
A	MA	HA	OA	I13A	I14A	B14A	B15A
B	MB	HB	OB	I13B	I14B	B14B	B15B
C	MC	HC	OC	I13C	I14C	B14C	B15C
D	MD	HD	OD	I13D	I14D	B14D	B15D
E	ME	HE	OE	I13E	I14E	B14E	B15E
F	MF	HF	OF	I13F	I14F	B14F	B15F
G	MG	HG	OG	I13G	I14G	B14G	B15G

Keterangan :

A : Kontrol positif

B : Kontrol negatif

C : Konsentrasi supernatan 20%

D : Konsentrasi supernatan 80%

E : Konsentrasi supernatan 60%

F : Konsentrasi supernatan 40%

G : Konsentrasi supernatan 20%

Giri Endah Anggraeni, 2017

POTENSI ANTIBAKTERI ISOLAT BAKTERI ENDOFIT AKAR TANAMAN OBAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*

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

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit dari akar tanaman *A. conyzoides* L. dan *V. zizanioides* L., sedangkan sampel dari penelitian ini adalah 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. Sementara itu sampel yang akan dijadikan parameter ialah *E. coli* dan *S. aureus* yang bersifat patogen pada manusia.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian mulai dilaksanakan pada bulan Agustus hingga Oktober 2017 di Laboratorium Riset, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

E. 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.

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yakni :

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Medium

Dilakukan pembuatan terhadap medium yang digunakan untuk mengkultur bakteri dan uji MIC yaitu Luria Bertani (LB agar dan LB cair), sedangkan medium yang digunakan dalam uji antibakteri difusi cakram yaitu *Muller Hilton* agar.

b. Sterilisasi

Giri Endah Anggraeni, 2017

POTENSI ANTIBAKTERI ISOLAT BAKTERI ENDOFIT AKAR TANAMAN OBAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*

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

Semua alat, bahan, dan medium yang akan digunakan dalam penelitian ini disiapkan dan disterilisasi dengan cara sterilisasi basah. 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 dan Bakteri Patogen Uji

Sampel bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus* serta 7 Isolat bakteri endofit yang diawetkan dalam *cryo* penelitian sebelumnya disubkultur secara bertingkat pada LB agar dalam cawan petri yang telah disterilisasi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, sehingga menghasilkan isolat murni yang kemudian disubkultur pada medium LB agar miring.

b. Penyediaan Inokulum

Penyediaan inokulum dilakukan menggunakan metode suspensi koloni secara langsung (CLSI, 2012). Diinokulasikan bakteri dari LB agar miring yang telah diinkubasi selama 16-20 jam ke dalam NaCl 0,85% steril, kemudian dihomogenkan dengan cara divortex. Dilakukan pengukuran nilai turbiditas menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan NaCl 0,85% tanpa inokulum sebagai blanko. Turbiditas suspensi disesuaikan hingga setara dengan standar 0,5 *McFarland*. Jika terlalu tinggi dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,85% steril, sedangkan jika terlalu rendah dilakukan penambahan bakteri uji, hingga mencapai nilai turbiditas yang setara dengan standar turbiditas 0,5 *McFarland*. Standar turbiditas *McFarland* biasanya digunakan untuk menstandarisasi perkiraan jumlah bakteri dalam suspensi cair secara visual, yaitu dengan membandingkan turbiditas suspensi uji dengan standar turbiditas *McFarland* (NCCLS, 2003).

c. Uji Antagonis Isolat Bakteri Endofit terhadap *E. coli* dan *S. aureus*

Menurut Ismail dan Tenrirawe (2011) uji antagonis digunakan untuk membuktikan bahwa mikroorganisme yang bersifat antagonis dapat menghambat aktivitas mikroorganisme lain yang berada pada tempat yang sama atau berdekatan. 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 miring selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, sebanyak 1 ml suspensi inokulum dimasukkan ke dalam cawan petri steril dengan diameter 15 cm. Kemudian dimasukkan 9 ml medium LB agar cair yang sudah hangat kuku. Suspensi bakteri patogen dan medium LB agar 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 bakteri patogen dan medium LB agar tadi. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Potensi isolat bakteri endofit untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekeliling isolat bakteri endofit.

d. Pengumpulan Supernatan (Metabolit Sekunder) Isolat Bakteri Endofit

Pengumpulan supernatan sebagai perlakuan pada uji aktivitas antibakteri dilakukan berdasarkan metode Tanuwijaya (2015) dengan modifikasi. Lima isolat bakteri endofit (O, I13, I14, B14, dan B15) yang menunjukkan aktivitas antibakteri pada uji antagonis 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 (Tabel 3.1). Kultur yang telah dipanen kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pellet dan supernatannya. Supernatan hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung mikro steril dan dibuat gradien konsentrasi 20%, 40%, 60%,

80%, dan 100% dengan cara menambahkan aquades steril. Selanjutnya supernatan disimpan dalam suhu 4°C agar tidak cepat rusak.

Data hasil pengukuran kurva tumbuh dari ke-7 isolat bakteri endofit yang dilakukan pada penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Waktu Stasioner Isolat Bakteri Endofit

No	Nama spesies bakteri	Kode isolat	Waktu stasioner (jam ke-)	Waktu panen (jam ke-)
1	<i>Acinetobacter</i> sp.	M	21, 22, 23	21
2	<i>P.aeruginosa</i>	O	20, 21, 22	21
3	<i>Pantoea</i> sp.	H	25, 26, 27	27
4	<i>Pantoea</i> sp.	I13	12, 13, 14, 15	14
5	<i>Klebsiella pneumonia</i>	I14	12, 14, 16	16
6	<i>Staphylococcus equorum</i>	B14	13, 15, 17	15
7	<i>Staphylococcus</i> sp.	B15	16, 17, 18	16

*Keterangan : Waktu stasioner isolat bakteri endofit didapatkan dari penelitian Pratiwi (2013), Ihsan (2013), dan Risma (2016).

e. Uji Antibakteri

1) Metode Difusi Cakram

Pengujian aktivitas antibakteri supernatan pada tahap awal dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar (*kirby-bauer*) dengan teknik *pour plate*. Media yang digunakan dalam metode difusi cakram ini adalah *Mueller Hinton* agar.

Supernatan dari masing-masing isolat bakteri endofit digunakan sebagai sampel perlakuan untuk bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Pengulangan dari setiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali dengan kontrol negatif menggunakan akuades steril (Miranti *et al.*, 2013) dan kontrol positif menggunakan tetrasiklin dengan konsentrasi 2 mg/L untuk *E. coli* dan 0,5 mg/L untuk *S.aureus* (Andrews, 2008). Sebanyak 1 ml inokulum dari masing-masing

bakteri patogen dimasukkan ke dalam cawan petri steril dengan diameter 15 cm yang berisi 9 ml medium MHA steril kemudian dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Masing-masing supernatan disiapkan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Kemudian kertas cakram steril yang berukuran 6mm direndam dalam supernatan yang telah tersedia selama 2 menit (Akinyemi, 2005). Setelah itu kertas cakram diletakkan di atas medium yang telah berisi biakkan bakteri dan diinkubasi selama 16-20 jam. Zona hambat yang terbentuk kemudian diukur (CLSI, 2012).

Parameter pada uji ini adalah inhibisi pertumbuhan bakteri dengan mengukur daerah bening di sekitar cakram menggunakan jangka sorong (Cappucino dan Sherman, 1987). Davis dan Stout (2009) mengelompokkan kekuatan daya antibakteri menjadi empat kategori berdasarkan besar zona hambat yang terbentuk, yaitu sebagai berikut.

Tabel 3.3 Kategori Daya Antibakteri
(Davis dan Stout, 2009)

Besar zona hambat	Kategori
<5 mm	lemah
5-10 mm	sedang
10-20 mm	kuat
>20 mm	sangat kuat

2) Metode Dilusi Cair

Untuk menentukan nilai MIC digunakan metode *microbroth dilution* dalam 96 sumur untuk kedua jenis bakteri patogen yang diujikan. Dilakukan pengenceran dua kali lipat terhadap supernatan dan inokulum yang turbiditasnya telah setara dengan 0,5 *McFarland standar* dengan menggunakan LB cair. Selanjutnya sebanyak 100 µl medium LB cair, 50 µl inokulum yang telah diencerkan, dan 50 µl supernatan yang telah diencerkan didistribusikan ke dalam lempeng microtiter. Lempeng microtiter diinkubasi pada suhu 37°C semalam tanpa pengocokkan. Nilai MIC ditentukan berdasarkan konsentrasi

ekstrak paling kecil yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri (Balouiri, *et al.*, 2016).

MBC didefinisikan sebagai konsentrasi agen antimikroba terendah yang dibutuhkan untuk membunuh 99,9% inokulum akhir setelah inkubasi selama 24 jam (Balouiri *et al.*, 2016). Penentuan nilai MBC dilakukan dengan metode lempeng agar. Sebanyak 100 μ l kultur dari tabung MIC diambil lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril dengan diameter 15 cm. Setelah itu dimasukkan 9 ml medium LB agar cair, dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Kultur diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Parameter pada uji ini yaitu dengan menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada lempeng agar (Doughari, 2006). Untuk menentukan nilai MBC, konsentrasi supernatan yang dipilih adalah konsentrasi terendah yang jumlah koloninya mendekati nol atau 99% dapat membunuh bakteri (Mayer, 2010).

3. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan program SPSS 17.0 *for windows*. Data yang dianalisis ialah data hasil pengukuran diameter zona hambat dari uji aktivitas antibakteri. Jenis analisis data yang dilakukan diantaranya:

a. Uji Normalitas

Uji normalitas masing-masing dilakukan pada kelompok perlakuan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan taraf kepercayaan sebesar 95%. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui sebaran data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik.

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas masing-masing dilakukan pada kelompok perlakuan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, menggunakan uji *Lavene* dengan taraf kepercayaan sebesar 95%. 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.

c. Uji *two ways Anova*

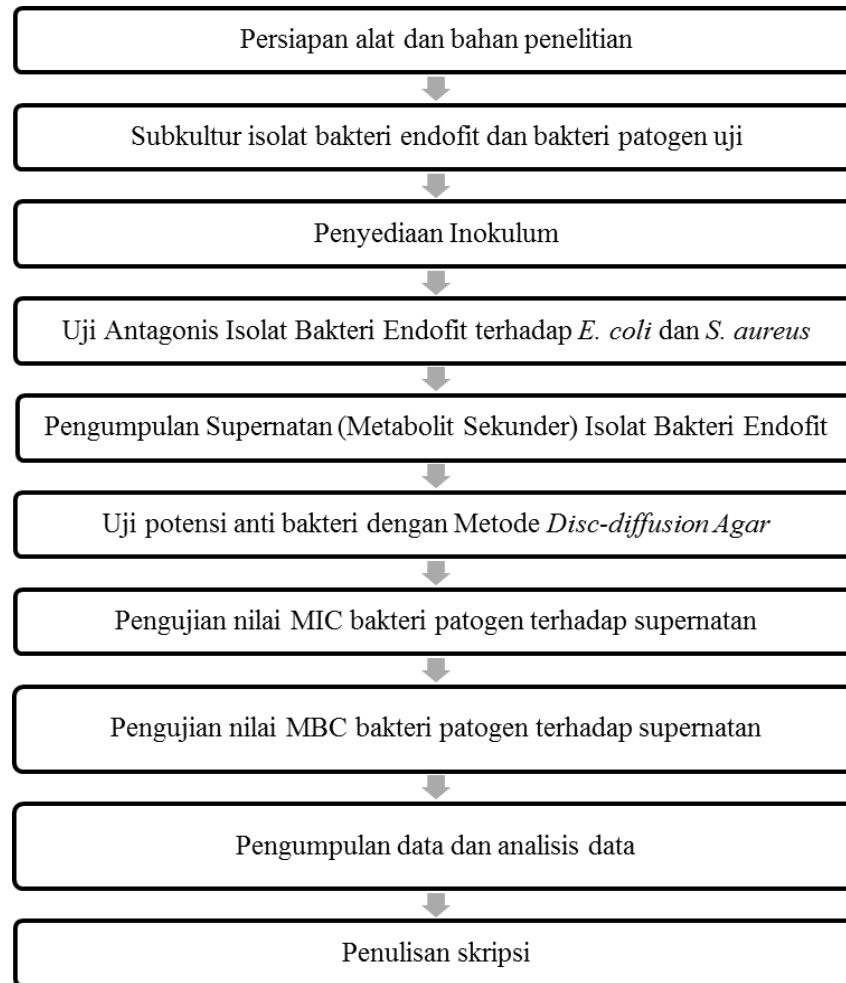
Pengujian statistika pada kelompok perlakuan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang memiliki sebaran data normal dan homogen dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *two ways Anova* dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perbedaan konsentrasi supernatan dan isolat bakteri terhadap diameter zona hambat bakteri uji.

d. Uji Duncan

Post Hoc uji Duncan untuk mengetahui perbedaan rata-rata diameter zona hambat dari setiap perlakuan dengan taraf kepercayaan sebesar 95%.

G. Alur Penelitian

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



Gambar 3.1 Alur Penelitian