

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah batang segar kangkung darat (*Ipomoea reptans* Poir.) yang diperoleh dari daerah Surabaya pada bulan Oktober 2021. Kriteria batang yang diambil yaitu tangkai panjang, bertepi rata, tidak ada luka atau berlubang dan tidak terinfeksi oleh hama.

3.2.2 Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Potato Dextrose Agar (Merck)*, media *Mannitol Salt Agar (Merck)*, media *Plate Count Agar (Merck)*, media *Nutrient Agar (Merck)*, media *Starch Agar (Merck)*, media *Milk Agar Base (Merck)*, media *Neutral Red Agar (Merck)*.

3.2.3 Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Bakteri uji didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

3.2.4 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah kloramfenikol, alkohol 70% v/v (*Brataco*), natrium hipoklorit 5,3%

(*Brataco*), natrium klorida, HCl, ½ McFarland I, larutan laktofenol, dan larutan iodium.

3.2.5 *Bahan Lain*

Akuades, susu skim, *oleum coccus*, dan tisu steril.

3.2.6 *Alat Penelitian*

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting, pisau bedah, cawan petri, tabung reaksi (*Pyrex*, Indonesia), Erlemenyer (*Duran*, Jerman), *beaker glass* (*Duran*, Jerman), mikroskop (*Olympus*, Jerman), kamera mikroskop (*OptiLab*, Indonesia), pipet ukur (*HBG*, Jerman), *vortex* (*Labinco*, Belanda), jangka sorong, timbangan analitis (*Sartorius*, Jerman), penangas air, oven (*Binder*, Jerman), *autoclave* (*All American*, America), incubator (*Binder*, Jerman), *Laminar Air Flow* (LAF) (*Minihelic*).

3.3 **Variabel Penelitian**

3.3.1 *Tahap Isolasi*

Variabel yang digunakan dalam tahap isolasi ini adalah variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau menentukan hasil dari penelitian ini yaitu batang yang digunakan. Variabel terkontrol adalah variabel disamakan yang bertujuan meminimalisir adanya variasi hasil meliputi pemilihan batang, proses sterilisasi permukaan batang, suhu dan waktu inkubasi, media pertumbuhan. Variabel tergantung adalah variabel yang hasilnya dipengaruhi variabel bebas, yaitu jumlah kapang endofit yang diperoleh.

3.3.2 Tahap Uji Aktivitas

Variabel yang digunakan dalam tahap isolasi ini adalah variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian tahapan uji aktivitas antibakteri yaitu jenis kapang endofit yang didapat. Variabel terkendali pada tahapan uji aktivitas antibakteri yaitu bakteri uji, suhu dan waktu inkubasi. Variabel tergantung pada penelitian tahapan uji aktivitas antibakteri yaitu diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP).

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan kapang endofit yang ditumbuhkan dari batang segar tanaman Kangkung darat (*Ipomoea reptans* Poir.). Batang tanaman Kangkung darat segar yang telah dibersihkan, kemudian diamati makroskopis dan mikroskopisnya. Sterilisasikan batang kangkung darat dicuci dengan air mengalir untuk membebaskan dari kotoran dan debu. Batang kangkung darat dipotong menjadi beberapa bagian sepanjang 5 cm sehingga mudah direndam untuk proses sterilisasi permukaan. Proses sterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 2 menit, natrium hipoklorit 5,3% selama 5 menit dan selanjutnya direndam lagi dengan alkohol 70% selama 1 menit menggunakan pustaka Widjaja, Soegianto dan Ervina (2019). Setelah itu dibilas dengan akuades steril dan dikeringkan dengan kertas saring steril. Setelah batang kangkung darat disterilkan, batang kangkung darat dibelah dan dipotong menjadi bentuk yang lebih kecil kemudian ditanamkan dalam lempeng *Potato Dextrose Agar* kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2-4 hari. Proses pemurnian, diambil masing-masing koloni kapang endofit yang secara makroskopis berbeda dan menginokulasikan ke dalam media *Potato Dextrose Yeast broth* 1 mL dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2-4 hari. Koloni yang telah tumbuh

dipindahkan ke dalam media *Potato Dextrose Agar*. Proses ini dilakukan berulang kali hingga didapatkan koloni kapang endofit yang benar-benar murni.

3.5 Tahap Penelitian

3.5.1 *Pengambilan Sampel*

Kriteria pengambilan batang kangkung darat sebagai sampel yaitu tangkai panjang, bertepi rata, tidak ada luka atau berlubang dan tidak terinfeksi oleh hama.

3.5.2 *Determinasi, Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Batang Kangkung Darat (Ipomoea reptans Poir.)*

Batang kangkung darat dibersihkan dengan air mengalir, kemudian diamati secara makroskopis, meliputi warna dan ukuran. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan membuat preparat batang kangkung darat, batang kangkung dibelah kemudian dipotong tipis batang kangkung secara melintang dan membujur. Irisan kangkung diletakkan di atas kaca objek yang sebelumnya sudah ditetaskan air dan amati, kemudian ditetesi kloralhidrat dan dilakukan pengamatan dan yang terakhir ditetesi dengan *floroglusin* dan HCl dan diamati. Bagian-bagian yang amati pada mikroskopis adalah bagian epidermis, parenkim, xylem, floem dan korteks.

3.5.3 *Isolasi Kapang Endofit dari Batang Kangkung Darat (Ipomoea reptans Poir.)*

Batang kangkung darat dipotong menjadi beberapa bagian sepanjang 5 cm sehingga mudah direndam untuk proses sterilisasi permukaan. Proses sterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 2 menit dan natrium hipoklorit 5,3% selama 5 menit menggunakan pustaka Widjaja,

Soegianto dan Ervina (2019). Setelah itu dibilas dengan akuades steril dan dikeringkan dengan kertas saring steril. Setelah batang kangkung darat disterilkan, batang kangkung darat dibelah dan dipotong menjadi bentuk yang lebih kecil kemudian ditanamkan dalam lempeng *Potato Dextrose Agar* yang telah ditambahkan antibiotik kloramfenikol dan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2-4 hari.

3.5.4 *Pemurnian Kultur Kapang Endofit dari Batang Kangkung Darat (Ipomoea reptans Poir.)*

Koloni kapang endofit yang tumbuh berbeda secara makroskopis diambil dan diinokulasikan ke dalam media *Potato Dextrose Yeast broth* 1 mL dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2-4 hari. Koloni yang telah tumbuh dipindahkan ke dalam media *Potato Dextrose Agar*. Proses ini dilakukan berulang kali hingga didapatkan koloni kapang endofit yang benar-benar murni atau tidak ada kapang endofit berbeda secara makroskopis yang tumbuh pada satu cawan petri.

3.5.5 *Penyiapan Bakteri Uji*

Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Bakteri uji dipastikan kemurniannya dengan pengamatan makroskopis dan mikroskopis dengan pengecatan Gram. Satu ose bakteri uji ditumbuhkan pada media *Manitol Salt Agar* miring kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, diinokulasikan bakteri uji ke dalam larutan NaCl 0,9% dan disetarakan kekeruhannya dengan suspensi ½ *McFarland I* ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Bakteri uji juga dapat ditumbuhkan dengan menggunakan media *Manitol Salt Agar* yang akan menghasilkan koloni berwarna kuning dengan daerah sekitar koloni berwarna kuning, karena adanya pembentukan asam hasil fermentasi manitol.

3.5.6 *Pengujian Aktivitas Antibakteri Kapang Endofit terhadap Staphylococcus aureus*

Sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 24 jam yang telah disetarakan dengan $\frac{1}{2}$ McFarland I ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) diinokulasikan ke dalam masing-masing plat 10 mL *Plate Count Agar*, divorteks dan dituang ke dalam cawan petri kemudian dilakukan prainkubasi selama 1,5 jam pada suhu 37°C. Kapang endofit yang telah ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Yeast Broth* yang berusia antara 2-4 hari diinokulasikan di atas media *Plate Count Agar* tersebut dan inkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan adanya daerah hambatan pertumbuhan yang ditandai dengan daerah jernih di sekitar koloni kapang endofit dapat dilihat pada Gambar 3.1. Rasio diameter DHP dihitung dengan rumus:

$$\text{Rasio diameter DHP} = \frac{\text{rata-rata diameter DHP}}{\text{rata-rata diameter kapang endofit}}$$

3.5.7 *Karakterisasi Kapang Endofit*

a. Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Kapang Endofit

Pengamatan Makroskopis dilakukan dengan mengamati kapang endofit yang sudah murni pada media *Potato Dextrose Agar* meliputi tipe koloni, sifat permukaan koloni, ukuran koloni, warna koloni, dan usia koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan membuat preparat hidup menggunakan laktofenol. Kemudian diamati bagian-bagian spesifiknya dengan mikroskop.

b. Uji Biokimia Kapang Endofit

1. Uji Hidrolisa Amilum

Starch Agar yang telah dicairkan dan didinginkan dalam penangas air pada suhu 50°C selama 10 menit dituang ke dalam cawan petri steril dan rotasi membentuk angka delapan. Kemudian setelah memadat, diinokulasikan kapang endofit pada cawan petri setebal mungkin, setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menuangkan 6 ml larutan iodium ke atas media *Starch Agar* dan diamati perubahan warna yang terjadi pada sekitar koloni. Hidrolisa dikatakan negatif jika terbentuk warna biru tua di sekitar koloni dan hidrolisa dikatakan positif jika terbentuk warna merah kecoklatan (hidrolisa parsial) atau jernih (hidrolisa total) di sekitar koloni.

2. Uji Hidrolisa Kasein

Media *Milk Agar Base* yang telah dicairkan dan didinginkan dalam penangas air pada suhu 70°C selama 10 menit ditambahkan susu skim steril sebanyak 1 ml, vorteks media setelah itu dituang ke dalam cawan petri steril dan rotasi membentuk angka delapan. Setelah media memadat, diinokulasikan kapang endofit pada cawan petri setebal mungkin, setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hidrolisa dikatakan positif jika terdapat daerah transparan disekitar koloni.

3. Uji Hidrolisa Lemak

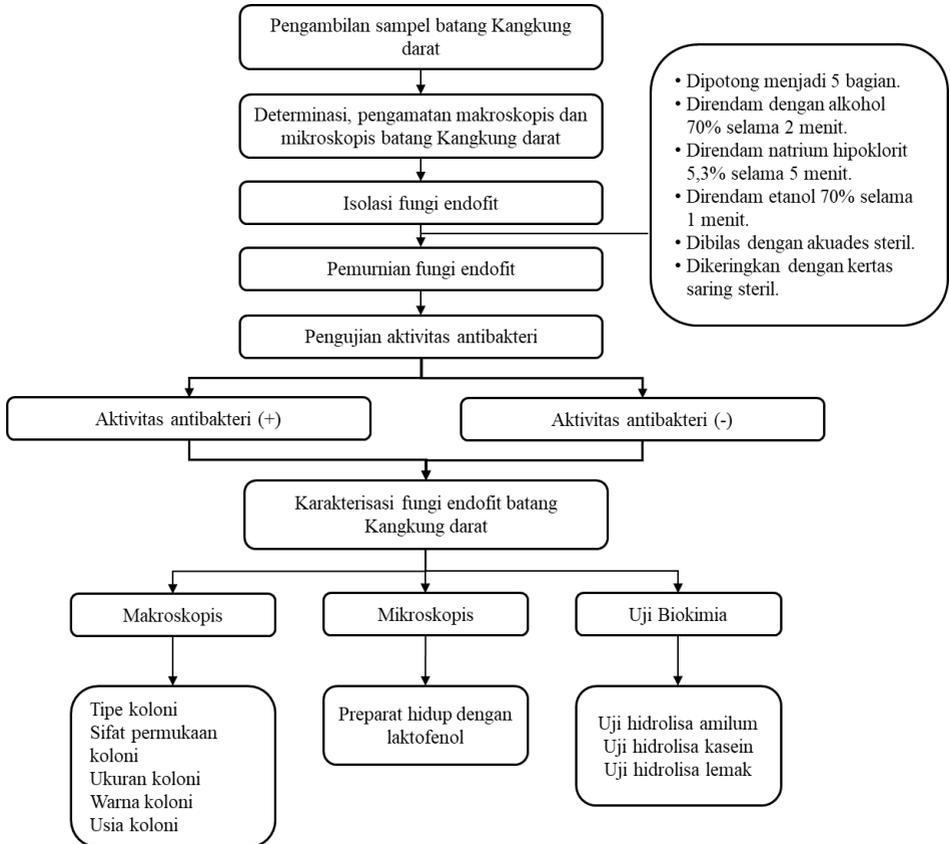
Media *Neutral Red Agar* yang telah dicairkan dan didinginkan dalam penangas air pada suhu 70°C selama 10 menit diberikan *oleum cocos* steril sebanyak 0,5 ml, kemudian

divorteks kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dan rotasi membentuk angka delapan. Setelah media memadat, diberi garis lurus pada dasar cawan petri untuk menandai bagian yang akan diinokulasikan dengan kapang endofit. Diinokulasikan kapang endofit pada cawan petri setebal mungkin, setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hidrolisa dikatakan positif jika terdapat warna merah di sekitar koloni dan hidrolisa dikatakan negatif jika terbentuk warna kuning di sekitar koloni.

3.5.8 *Analisis Data*

Rasio diameter DHP yang ditandai dengan terbentuknya daerah jernih di sekitar koloni kapang diukur dengan menggunakan jangka sorong. Nilai rasio didapatkan dengan membagi diameter DHP dengan diameter kapang. Karakterisasi dilakukan dengan menyesuaikan hasil pengamatan dengan pustaka Watanabe (2002).

3.6 Skema Kerja



Gambar 3.1 Skema Penelitian