

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Universitas Nasional, selama bulan Mei – Juli 2023.

B. Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan terdiri dari *laminar air flow*, autoklaf, oven, *rotary shaker*, lemari pendingin, inkubator, sentrifus, tabung sentrifuse, timbangan digital, pH universal, kompor listrik, gelas piala, labu erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, pembakar bunsen, gelas ukur, kain saring, pipet volumetrik, pinset, spatula, gunting, pisau, core borer, vortex mixer, bulb, scalpel, ose

Bahan yang digunakan adalah sampel dari akar serta daun dari pandan laut (*Pandanus tectorius*) hasil budidaya, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sebagai bakteri uji; Medium Malt Ekstrak Agar (MEA), Malt Ekstrak Broth (MEB), larutan NaCl 0.9 %, etanol 70%, Mc Farland 0.5, kertas cakram ukuran diameter 6 mm, spiritus, aquades, kloramfenikol 0,02 gram, clindamycin sebagai kontrol positif. Secara lebih jelas DOV dicantumkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV)

No	Variabel	Definisi Operasional Variabel (DOV)	Sumber	Satuan
1	Sumber Isolat	Didapatkan dari daun dan akar pandan laut dengan potongan seragam 3 cm.	Daun dan akar Pandan laut	cm

Tabel 1 lanjutan. Definisi Operasional Variabel (DOV)

No	Variabel	Definisi Operasional Variabel (DOV)	Sumber	Satuan
2	<i>Staphylococcus aureus</i> resisten metisilin dan <i>Escherichia coli</i>	Koloni bakteri yang diisolasi dari kultur stok kemudian diremajakan	Kultur stok	Standar mc farlan 0,5
3	Zona Hambat	Zona hambat atau bening yang terbentuk oleh jamur endofit diukur dengan menggunakan jangka sorong	Jamur endofit	mm

C. Cara Kerja

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk keperluan penelitian seperti pipet volumetrik, cawan petri, tabung reaksi, cakram kertas, kertas saring, core borer disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C.

2. Pembuatan Media untuk Pertumbuhan Mikroba

A. Pembuatan stok Media MEA (*Malt Extract Agar*)

Media MEA dibuat dengan cara menimbang MEA sebanyak 7,1 g, kloramfenikol 0.04 g, kemudian dilarutkan dengan akuades dalam 200 mL dan dipanaskan sampai mendidih. Media selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C (tekanan 1-2 atm).

B. Pembuatan stok Media MEB (*Malt Extract Broth*)

Media MEB dibuat dengan cara menimbang MEB sebanyak 4,75 g, kemudian dilarutkan dengan akuades dalam 250 mL dan dipanaskan sampai mendidih. Media selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C (tekanan 1-2 atm).

C. Pembuatan stok Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Media ini digunakan untuk pertumbuhan bakteri uji. Media MHA ditimbang sebanyak 7.6 g, bacto agar 1 g, kemudian dilarutkan dalam 200 mL akuades dan dipanaskan dengan diaduk sampai mendidih. Selanjutnya media disterilkan selama 15 menit pada suhu 121⁰C (tekanan 1-2 atm).

3. Pelaksanaan Penelitian

A. Sampling Tanaman

Sampel pandan laut berumur 8 bulan diambil di tempat budidaya pribadi. Dengan cara mencabut tanaman dari tanah, kemudian diambil bagian akar dan daunnya menggunakan gunting. Kemudian dimasukkan dalam plastik terpisah pada setiap bagian berbeda. Setelah itu dibawa ke laboratorium untuk proses lebih lanjut.



Gambar 1. Tanaman *Pandanus tectorius* muda

B. Sterilisasi Permukaan

Isolasi jamur endofit dari tumbuhan diawali dengan melakukan metode sterilisasi permukaan. Sterilisasi tersebut dilakukan dengan cara membersihkan bagian tumbuhan menggunakan akuades untuk menghilangkan kotoran yang menempel di bagian permukaan tumbuhan. Setelah sampel dibersihkan, dipotong dengan ukuran 3-4 cm. Kemudian potongan direndam menggunakan etanol 70% selama 2 menit.

Kemudian dilanjutkan dengan perendaman ke dalam larutan *clorox* selama 5 menit, direndam kembali ke dalam etanol 70 % selama 1 menit dan terakhir dimasukkan ke dalam akuades steril.

C. Isolasi Jamur Endofit

Isolasi jamur endofit dilakukan dengan metode tanam langsung, yaitu setelah perendaman terakhir menggunakan akuades steril. Selanjutnya, potongan sampel dikeringkan diatas kertas saring steril selama beberapa menit. Kemudian sampel diinokulasi diatas medium dengan memberi tekanan, dan bagian potongan berada di atas medium. Inokulasi sampel dilakukan diatas cawan Petri dan dilakukan duplo, tiap cawan berisi 3 potongan sampel. Selama pekerjaan dilakukan di dalam laminar air flow, selanjutnya diinkubasi sampai tumbuh koloni jamur pada suhu ruangan berkisar 27-29⁰C.

4. Pemurnian Jamur Endofit

Pemurnian ini bertujuan untuk memisahkan koloni jamur endofit yang bentuk makroskopisnya berbeda untuk dijadikan isolat tersendiri. Jamur endofit yang telah tumbuh pada media isolasi MEA, kemudian secara bertahap dimurnikan satu persatu. Masing-masing isolat murni jamur endofit yang diperoleh, dipindahkan ke dalam media MEA cawan Petri. Apabila masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda maka harus dipisahkan kembali sampai diperoleh isolat murni. Inkubasi pada suhu kamar selama 3-5 hari sesuai dengan pertumbuhannya. Setiap isolat murni dibuat duplo pada agar miring. Masing-masing sebagai kultur stok dan kultur untuk penelitian.

5. Identifikasi Jamur Endofit

Pengamatan bentuk makroskopis dilakukan kembali setelah inkubasi selama 5-7 hari, Ciri makroskopis yang diamati adalah warna jamur, koloni jamur dan bentuk tubuh buah jamur. Pengamatan ciri mikroskopis mencakup hifa, spora, sporangium, konidia dan konidiofor dan ciri khusus yang akan menentukan jenis jamur tersebut. Kemudian dilakukan pengamatan mikroskopis menggunakan mikroskop pada perbesaran 100x dan

40x, dengan cara mengambil benang hifa menggunakan ose, kemudian diletakkan pada gelas objek yang ditetesi pewarna *lactophenol cotton blue* (LPCB).

6. Fermentasi Jamur Endofit

Fermentasi jamur endofit dilakukan dengan fermentasi cair menggunakan media MEB. Koloni murni jamur endofit pada cawan petri MEA yang telah diinkubasi selama 5-7 hari, kemudian dilubangi untuk diambil menggunakan core borer sebanyak 5 potongan. Potongan jamur tersebut kemudian diinokulasikan ke dalam media fermentasi cair MEB sebanyak 20 mL dalam labu erlenmeyer ukuran 100 mL. Selanjutnya dilakukan fermentasi goyang terhadap labu erlenmeyer menggunakan rotary shaker 100 rpm pada suhu kamar selama 10 hari. Dari masing-masing kultur yang telah di shaker dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 40 rpm ukuran 15 mL yang sebelumnya disterilisasi terlebih dahulu, kemudian digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherhicia coli*.

7. Persiapan Bakteri Uji

Sebanyak satu ose koloni bakteri disuspensi ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9 %. Kekeruhannya diseragamkan dengan menggunakan standar Mc Farland 0,5 (kepadatan bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU) pada latar belakang hitam dan cahaya terang. Standar kekeruhan Mc Farland 0,5 dibuat dengan cara mencampurkan 0,1 mL larutan BaCl₂ 1% dengan 9,9 mL H₂SO₄ 1%. Kemudian swab steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri uji, kemudian ditiriskan dengan ujung swab ditekan dan diputar-putar pada dinding dalam tabung tabung untuk membuang kelebihan cairan. Selanjutnya swab tersebut dioleskan ke permukaan media sedemikian rupa supaya pertumbuhan bakteri merata.

8. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Kirby-Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas atau "*paper disc method*". Tiap-tiap cakram kertas kosong dipanaskan dengan oven pada suhu 70⁰C selama 15 menit, lalu kertas cakram dicelupkan ke dalam supernatan jamur endofit yang diperoleh. Cakram

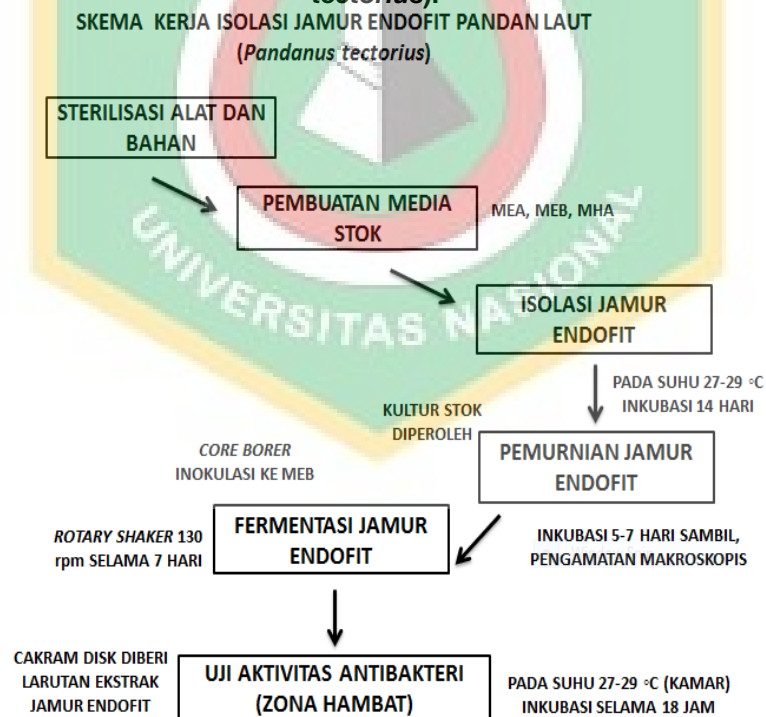
yang berisi supernatan didiamkan di atas kertas saring steril selama 15 menit, dan selanjutnya diletakkan pada permukaan media MHA yang telah berisi mikroba uji. Untuk kontrol positif menggunakan antibiotik *clindamycin*, sedangkan sebagai kontrol negatif digunakan cakram kertas yang telah dicelupkan medium MEB steril.

Jumlah cakram kertas yang diletakkan dalam satu cawan petri sebanyak 4 buah dan jarak antar cakram diatur supaya tidak terlalu dekat. Inkubasi dilakukan pada suhu terlihat zona bening di sekitar cakram kertas. Diameter zona hambat yang memiliki diameter ≤ 6 mm dikatakan tidak memiliki zona hambat. Konsentrasi yang memiliki diameter > 6 mm dikatakan memiliki zona hambat.

A. Skema Cara Kerja

Skema cara kerja isolasi jamur endofit pandan laut digambarkan pada Gambar 2. Urutan cara kerja berawal dari sterilisasi alat dan bahan, pembuatan stok media, isolasi, pemurnian, fermentasi hingga berakhir pada uji aktivitas antibakteri jamur endofit.

Gambar 2. Skema kerja isolasi hingga uji aktivitas antibakteri dari pandan laut (*Pandanus tectorius*).



D. Analisis Data

Model rancangan dalam analisis data adalah RAL-F (Rancangan Acak Lengkap 2 Faktorial), dengan faktor pertama berupa sembilan isolat jamur endofit dari berbagai sumber bagian pandan laut, serta faktor kedua berupa dua bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Zona hambat yang terbentuk didata menggunakan analisis statistik perangkat lunak dengan uji ANOVA satu arah (One Way) program Statistik SPSS (*Statistical Program For Social Science*) kemudian dilanjutkan dengan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) untuk mengetahui isolat fungi endofit yang baik dalam menghambat bakteri uji.

