

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis Penelitian ini dilakukan menggunakan metode deskriptif dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Penelitian dengan tipe deskriptif adalah pendekatan penelitian yang bertujuan untuk menggambarkan dan menginterpretasikan objek sebagaimana adanya. Data yang dilaporkan adalah data yang diperoleh peneliti secara alami sesuai peristiwa yang terjadi. Peristiwa yang terjadi secara alami memungkinkan peneliti untuk menemukan dan menjawab pertanyaan penelitian (Zellatifanny & Mudjiyanto, 2018). Pendekatan kualitatif menghasilkan data berbentuk narasi kalimat, sementara kuantitatif menghasilkan data berbentuk numerik (Parjaman & Akhmad, 2019). Penelitian ini mendeskripsikan karakteristik genus bakteri endofit pada daun tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium*) dan potensinya terhadap bakteri penyebab jerawat *Cutibacterium acnes*.

#### **3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Februari 2024 sampai dengan Juli 2024 yang dilaksanakan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia di Jalan Dr. Setiabudi No. 299 Bandung.

#### **3.3 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi yang digunakan adalah isolat bakteri endofit pada organ daun bagian pucuk yang berwarna merah dan daun yang berwarna hijau yang berasal satu tanaman pucuk merah (*S. myrtifolium*) pada fase generatif. Sampel yang digunakan adalah masing-masing bakteri endofit yang ditemukan pada daun tanaman *S. myrtifolium*. Teknik pengambilan sampel yang dilakukan yaitu teknik *purposive sampling* dengan memilih dan memilah subjek yang memenuhi kriteria yang telah

ditentukan. Daun pucuk merah yang digunakan berasal dari lingkungan Universitas Pendidikan Indonesia.

### **3.4 Prosedur penelitian**

#### **3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian**

Alat dan bahan yang digunakan berasal dari Laboratorium Riset bioteknologi FPMIPA UPI. Alat dan Bahan yang digunakan selengkapnya terlampir dalam Lampiran 1.

Pada tahap persiapan, Alat dan bahan dipersiapkan dengan memastikan ketersediaannya serta keberfungsian. Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat dibungkus dengan kertas dan plastik sebelum disterilisasi. Bahan yang perlu disterilisasi dimasukkan ke wadah yang bersih berbahan kaca kemudian diberi sumbat dan bungkus plastik. Pembuatan media dalam penelitian ini selengkapnya terlampir dalam Lampiran 2. Setelah dibungkus, alat dan bahan dilakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit di suhu 121°C. Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Riset Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia.

#### **3.4.2 Kultur Bakteri *C. acnes***

Satu koloni pembiakan bakteri murni *C. acnes* stok diambil kultur isolat bakteri dengan jarum ose steril lalu diinokulasikan pada permukaan media *Nutrient Agar* (NA) miring dan *Nutrient Broth* (NB), kemudian dinkubasi pada suhu 37 °C. Hasil subkultur selanjutnya digunakan untuk pembuatan suspensi dan pengujian antibakteri (Jamil dkk., 2023).

#### **3.4.3 Isolasi Bakteri Endofit**

Tahap sterilisasi awal dilakukan untuk mendapatkan endofit murni dari jaringan bagian dalam tanaman. Daun yang telah diambil dibersihkan permukaannya dengan air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran yang menempel pada permukaan daun. Sterilisasi permukaan daun dilanjutkan dengan dibilas akuades steril, kemudian direndam ke dalam alkohol 70% selama dua menit dan dilanjutkan dalam larutan 1% natrium hipoklorit (NaOCl) selama tiga menit.

Selanjutnya dilakukan perendaman kembali dengan alkohol 70% selama satu menit. Terakhir semua sampel dicuci dengan akuades steril (Sharma & Mallubhotla, 2022). Pemeriksaan sterilitas dilakukan untuk menilai efektivitas proses sterilisasi pada sampel. Proses ini dilakukan dengan cara 100µl akuades yang diambil dari pencucian akhir sampel disebar pada media NA, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Jika tidak ada mikroorganisme yang tumbuh setelah inkubasi maka dipastikan proses sterilisasi permukaan berhasil (Octaviani dkk., 2022).

Sampel daun yang sudah steril dipotong secara steril dengan ukuran 1 cm dan ditanam pada media NA yang ditambahkan nystatin (0,01%) untuk mencegah pertumbuhan jamur. Setelah inkubasi 37 °C selama 48 jam, koloni bakteri yang berbeda secara morfologi pada media agar NA diambil secara selektif dan digores kembali untuk mendapatkan isolat bakteri murni. Isolat-isolat yang disubkultur pada media NA disimpan pada suhu 4 °C sebelum digunakan kembali (Astuty dkk., 2019).

#### **3.4.4 Identifikasi Morfologi bakteri Endofit**

Untuk Identifikasi bakteri endofit daun *S. myrtifolium* dilakukan dengan pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis. Karakteristik morfologi makroskopis dilakukan dengan pengamatan pada koloni berdasarkan bentuk, tepian, elevasi, dan warna koloni bakteri. Karakteristik morfologi mikroskopis diamati berdasarkan morfologi sel dengan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x.

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memperjelas sel bakteri berdasarkan zat warna sehingga ditentukan pengelompokan bakteri berdasarkan komponen dinding sel, yaitu terdapat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Tahap pewarnaan Gram awal dilakukan dengan meneteskan larutan fisiologis (NaCl 0,85%) pada kaca objek dan bakteri diinokulasi di atasnya. Kaca objek selanjutnya dikering anginkan dan fiksasi dengan melewatkannya di atas api bunsen. Isolat bakteri pada kaca objek ditetesi dengan zat warna *crystal violet* dan diamkan selama satu menit. Zat warna *crystal violet* dibersihkan dengan air mengalir. Isolat bakteri pada kaca objek ditetesi dengan larutan iodine dan diamkan selama satu menit, kemudian dibilas

dengan air mengalir. Isolat bakteri dilakukan dekolorisasi dengan ditetesi alkohol 95%, kemudian dibilas dengan air mengalir. Isolat bakteri kembali diwarnai dengan zat warna safranin dan didiamkan selama 45 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir. Hasil pewarnaan dikeringkan dengan kertas saring kemudian ditetaskan minyak imersi untuk dilakukan pengamatan dengan mikroskop perbesaran 1000x (Cappuccino & Welsh, 2019).

Pewarnaan endospora dimulai dengan membuat preparat olesan isolat murni. Preparat kemudian ditetesi dengan pewarna *Malachite Green* dan dipanaskan menggunakan uap air yang dipanaskan pada *hot plate*. Preparat dibiarkan selama 2-3 menit. Preparat kemudian dibilas dengan air mengalir. Preparat selanjutnya ditetesi safranin dan didiamkan 30 detik. Setelah dicuci air mengalir, preparat dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop. Pada pengamat mikroskop dengan perbesaran 1000x, akan terlihat spora yang berwarna hijau dan sel vegetatif yang berwarna merah (Cappuccino & Welsh, 2019).

### 3.4.5 Uji Aktivitas Biokimia

Terdapat beberapa pengujian aktivitas biokimia pada isolat bakteri endofit, yaitu:

#### 1) Uji Fermentasi Karbohidrat

Media yang digunakan adalah NB dengan karbohidrat spesifik (glukosa, sukrosa, dan laktosa) dan *Brom Cresol Purple* (BCP) ditambahkan sebagai indikator dalam pengujian. Bakteri diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi media dan tabung durham, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil inkubasi diamati berdasarkan perubahan warna dan gas. Hasil positif menunjukkan perubahan warna pada media ungu menjadi kuning dan terbentuknya gas pada tabung durham (Cappuccino & Welsh, 2019).

#### 2) Uji Hidrolisis pati

Isolat bakteri diinokulasikan pada media agar pati, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37 °C. Media agar pati yang telah diinkubasi dituangkan larutan yodium selama 30 detik dan buang larutan yang berlebihnya. Kultur diperiksa

ada tidaknya warna biru kehitaman di sekitar pertumbuhan setiap organisme uji (Cappuccino & Welsh, 2019).

3) Uji Hidrolisis Gelatin

Isolat bakteri diinokulasikan pada media nutrient gelatin dengan teknik tusuk, kemudian diinkubasi 48 jam pada suhu 37 °C. Kultur tabung disimpan dalam lemari es pada suhu 4 °C selama 30 menit. Hasil positif menunjukkan media tetap dalam keadaan cair menghasilkan gelatinase (Cappuccino & Welsh, 2019).

4) Uji Hidrolisis Lipid

Uji hidrolisis lipid dilakukan menggunakan medium agar lipid . Hasil positif ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni dan perubahan warna medium lipid menjadi merah di bawah koloni bakteri. Perubahan warna ini disebabkan oleh pembentukan asam lemak yang menyebabkan penurunan pH medium. Medium agar lipid diinokulasi dengan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Cappuccino & Welsh, 2019).

5) Uji Hidrolisis Kasein

Uji hidrolisis kasein menggunakan medium agar susu skim. Bakteri diinokulasikan pada medium ini dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Uji hidrolisis kasein menggunakan medium agar susu skim. Bakteri diinokulasikan pada medium ini dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Welsh, 2019)

6) Uji Methil Red

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media MR-VP, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil inkubasi ditetaskan indikator *methyl red* sebanyak dua tetes. Cincin merah yang terbentuk menunjukkan reaksi positif (Cappuccino & Welsh, 2019).

7) Uji Voges-Proskauer

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media MR-VP, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil inkubasi diteteskan dengan dua tetes reagent Barrit A (naphtol) dan Barrit B (KOH). Cincin merah yang terbentuk menunjukkan reaksi positif (Cappuccino & Welsh, 2019).

8) Uji Katalase

Isolat bakteri diinokulasikan pada kaca objek, beri 1-2 tetes 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diatas permukaan isolat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas (Cappuccino & Welsh, 2019).

9) Uji Penggunaan Sitrat

Isolat bakteri diinokulasikan pada media *Simmon Citrate Agar*, kemudian diinkubasi selama 48-96 jam pada suhu 35 °C. Hasil positif ditunjukkan dengan warna biru, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan warna hijau (Cappuccino & Welsh, 2019).

10) Uji SIM (*Sulfide, Indole, Motility*)

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium SIM agar secara tegak lurus, kemudian diinkubasi 48 jam pada suhu 37 °C. Tambahkan 10 tetes pereaksi *kovac*. Hasil positif H<sub>2</sub>S menunjukkan perubahan warna menjadi medium menjadi hitam. Hasil positif indol ditunjukkan dengan terbentuknya cincin berwarna merah (Cappuccino & Welsh, 2019).

#### **3.4.6 Skrining Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri**

Isolat bakteri endofit ditumbuhkan dalam media agar miring NA selama 16 jam dalam suhu 37 °C. Aktivitas antibakteri ditentukan menggunakan bakteri uji *C. acnes*. Kultur bakteri uji ditumbuhkan selama 16 jam pada media NB dengan suhu 37 °C. Kultur bakteri uji sebanyak 1 mL dituang ke dalam cawan petri steril kemudian ditambahkan dengan media NA. Media dihomogenkan dengan menggoyangkan membentuk angka delapan. Bakteri endofit diinokulasikan pada permukaan media dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C (Sharma & Mallubhotla, 2022).

Fiqha Azkiya, 2024

**ISOLASI BAKTERI ENDOFIT DAUN PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium* Walp.) DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Cutibacterium acnes***

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

### 3.4.7 Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri Endofit

Kurva pertumbuhan bakteri digunakan untuk bakteri endofit yang berasal dari inokulasi daun *S. myrtifolium*. Satu ose isolat bakteri endofit diinokulasikan pada media NB sebanyak 50 mL, kemudian di *shaker* pada suhu 37 °C selama 48 jam dengan kecepatan 120 rpm. Diambil inokulum 1,5 mL setiap 2 jam sekali untuk dilakukan pengukuran optikal densitas pada panjang gelombang 600 nm (OD600) menggunakan spektrofotometer UV-Vis setiap dua jam. Nilai absorbansi menunjukkan kepadatan sel pada medium kultur bakteri. Pengukuran dilakukan hingga ditemukan fase stasioner (Pratama dkk., 2015). Kurva pertumbuhan dibuat dari data hasil pengukuran nilai absorbansi, dimana sumbu x sama dengan interval waktu observasi sedangkan sumbu y sama dengan nilai absorbansi (Wahyuningsih & Zulaika, 2018).

### 3.4.9 Ekstraksi Supernatan Bakteri Endofit

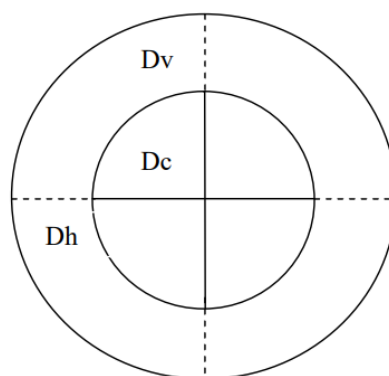
Isolat bakteri endofit diambil satu ose dibiakkan dalam media 25 mL NB dan diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 120 rpm hingga mencapai fase stasioner. Fase stasioner diperoleh berdasarkan hasil data dari kurva tumbuh bakteri. Proses pemisahan biomassa sel dari medium NB yang mengandung metabolit sekunder bakteri endofit (supernatan) dilakukan melalui sentrifugasi. Kultur bakteri endofit kemudian dipindahkan dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit (Ramadhanty dkk., 2021). Supernatan kemudian diberi etil asetat dengan perbandingan 1:1. Campuran ini disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas dipisahkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C untuk memperoleh hasil ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit yang kental (Husseiny dkk., 2021).

Ekstrak supernatan dilarutkan menggunakan DMSO (Dimetil sulfoksida) dengan konsentrasi berbeda. Konsentrasi yang digunakan sebesar 5,0 mg/mL; 20,0 mg/mL; 35,0 mg/mL; dan 50,0 mg/mL. Pemilihan konsentrasi ekstrak supernatan merujuk pada penelitian yang dilakukan Diale dkk. (2018). Larutan ekstrak supernatan kemudian digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri.

### 3.4.10 Uji Aktivitas Antibakteri

#### 3.4.10.1 *Disc Diffusion Assay (DDA)*

Pengujian antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram atau Kirby Bauer (*Disc Diffusion Method*). Sebanyak 1 mL suspensi bakteri yang uji diinokulasikan pada 10 mL media NA. Cawan petri dihomogenkan dengan digoyangkan membentuk angka delapan, agar bakteri tersebar. Cakram kertas dengan ukuran 6 mm steril yang sudah direndam dalam ekstrak supernatan bakteri endofit dengan konsentrasi berbeda (5,0; 20,0; 35,0; dan 50,0 mg/mL) ditempatkan di atas media NA. Selanjutnya, inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama ±24 jam (Sari dkk., 2020). Proses serupa diterapkan untuk pengujian kontrol positif dan negatif. Pengujian untuk kontrol positif kertas cakram direndam dalam larutan antibiotik klindamisin 15 µg/mL, sementara kontrol negatif kertas cakram direndam dalam DMSO. Pengulangan dilakukan pada setiap konsentrasi sebanyak tiga kali. Pengukuran zona hambat dilakukan setelah inkubasi selama ±24 jam. Zona hambat ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram (Saadah dkk., 2020).



Gambar 3. 1 Pengukuran diameter zona hambat

Perhitungan diameter zona hambat dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$d = \frac{A + B}{2}$$



Keterangan:

d = diameter zona hambat

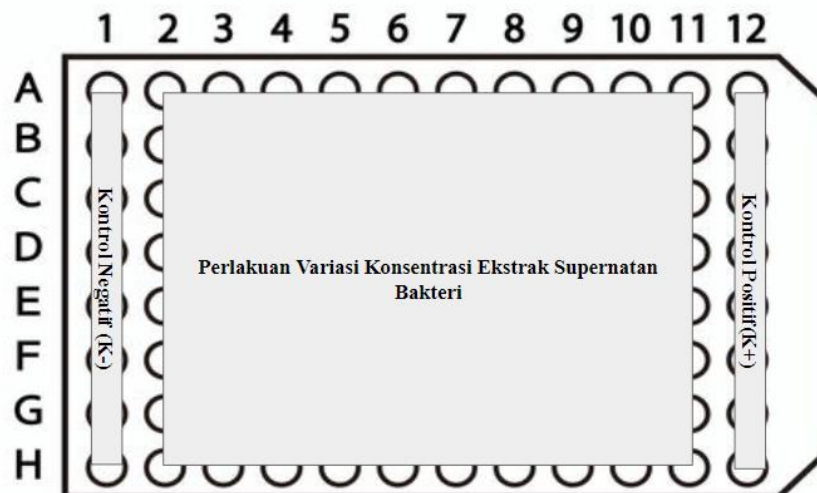
A = diameter vertikal (Dv) – diameter cakram (Dc)

B = diameter horizontal (Dh) – diameter cakram (Dc)

Hasil perhitungan dikaitkan dengan ketentuan kriteria daya hambat. Zona hambat dengan ukuran  $\geq 20$  mm dianggap menunjukkan aktivitas daya hambat yang sangat kuat. Zona hambat dalam rentang 11-20 mm dianggap memiliki aktivitas daya hambat yang kuat, sementara zona hambat dengan ukuran 6-10 mm dianggap menunjukkan aktivitas daya hambat yang sedang. Zona hambat dengan ukuran  $\leq 5$  mm dianggap memiliki aktivitas daya hambat yang lemah (Kolopita dkk., 2022).

#### 3.4.10.2 *Minimum Inhibitor Concentration (MIC)*

Pengujian *Minimum Inhibitor Concentration (MIC)* pada bakteri *C. acnes* dilakukan dalam 96-well plate sesuai dengan metode mikrodilusi standar. Sumur ke-1 hingga ke-11 dari kiri ke kanan dimasukkan 100  $\mu$ l kultur bakteri uji pada medium NB ke dalam setiap sumur well plate. Hal ini dilakukan dalam tiga ulangan. Setelah itu, 100  $\mu$ l ekstrak supernatan yang diuji dimasukkan dengan variasi konsentrasi dari sumur 11 sampai 2, yaitu: 5,0 mg/mL; 4,5 mg/mL; 4,0 mg/mL; 3,5 mg/mL; 3,0 mg/mL; 2,5 mg/mL; 2,0 mg/mL; 1,5 mg/mL; dan 1,0 mg/mL. Pada sumur ke-1 yang merupakan kontrol negatif ditambahkan DMSO sebanyak 100  $\mu$ L, sedangkan sumur ke-12 adalah kontrol positif ditambahkan 100  $\mu$ L larutan antibiotik klindamisin 15 mg/mL. Skema pengujian MIC terdapat pada Gambar 3.2.



Gambar 3. 2 Skema Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (Dokumentasi Pribadi, 2024)

#### 3.4.10.3 *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Penentuan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dilakukan dengan cara sebanyak 100  $\mu$ l kultur pada uji MIC diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium NA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri setelah inkubasi dapat menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut adalah MBC, yaitu konsentrasi minimum dari senyawa yang mampu membunuh bakteri secara total. Proses ini memastikan bahwa konsentrasi senyawa tidak hanya menghambat pertumbuhan bakteri tetapi juga membunuhnya sepenuhnya (Assad dkk., 2021).

### 3.5 Analisis Data

Data hasil identifikasi bakteri berdasarkan pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis, serta uji aktivitas biokimia dianalisis secara deskriptif. Bakteri dikarakterisasi dan diidentifikasi hingga tingkat genus dengan mengacu pada *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9 th ed.).

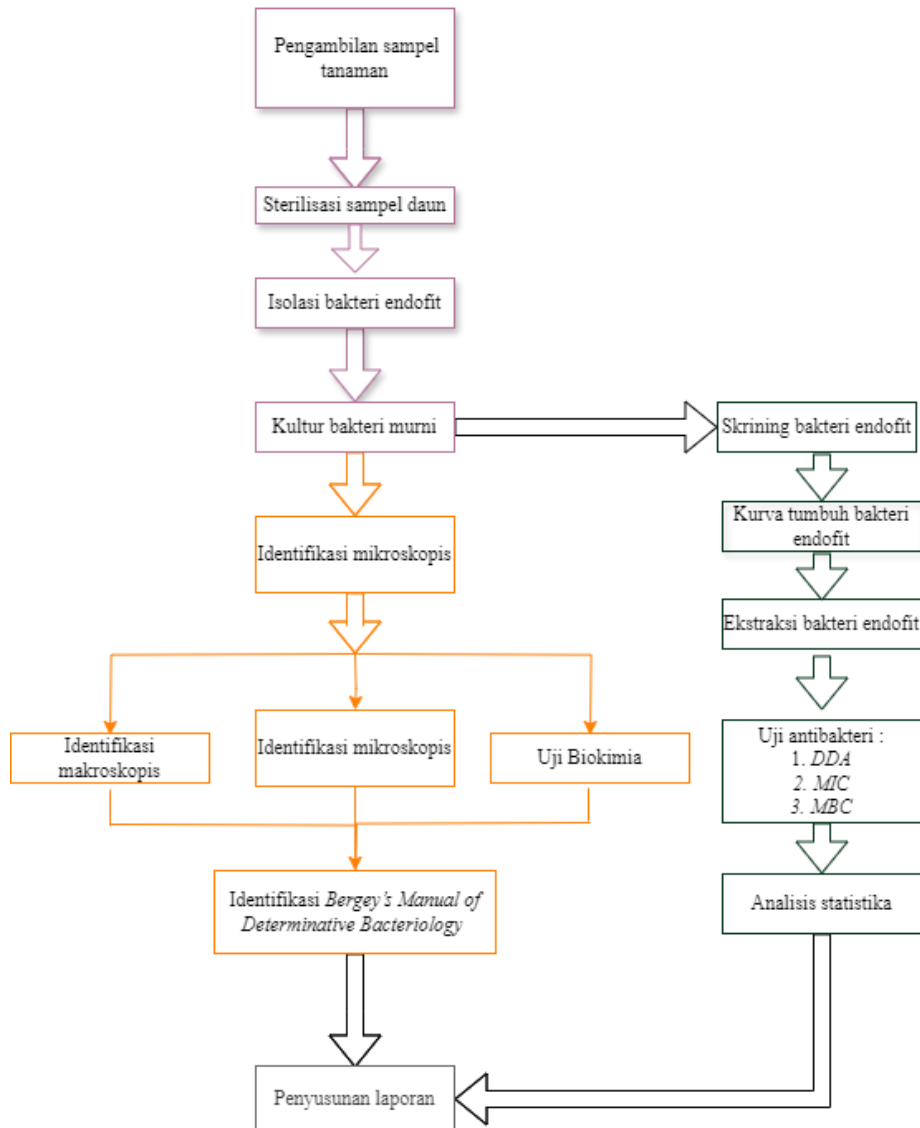
Data hasil uji antibakteri dianalisis kuantitatif menggunakan statistika dengan aplikasi *IBM Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Analisis statistika yang digunakan yaitu uji normalitas dengan menggunakan uji distribusi normal *Shapiro-wilk* dan selanjutnya uji homogenitas (*Levene test*). Uji normalitas

digunakan untuk mengevaluasi data yang dimiliki terdistribusi normal atau tidak. Uji homogenitas bertujuan untuk meyakinkan bahwa sekumpulan data yang akan diukur berasal dari populasi yang homogen. Data dianggap normal dan homogen jika nilai signifikansinya lebih besar dari 0,05 ( $\text{sig} > 0,05$ ), kemudian dilanjutkan dengan uji *oneway* ANOVA. Jika data tidak memenuhi kriteria terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* pada tingkat kepercayaan 95%.

### **3.6 Alur Penelitian**

Pada penelitian ini terdapat tahapan-tahapan penting yang melibatkan isolasi, identifikasi, dan pengujian bakteri endofit. Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel tanaman dan persiapan media kultur, kemudian dilakukan isolasi bakteri endofit dan dilanjutkan dengan kultur murni. Identifikasi bakteri dilakukan melalui pengamatan makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia, serta perbandingan dengan data pada buku panduan identifikasi bakteri. Setelah identifikasi, dilakukan uji lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan pertumbuhan bakteri dan potensinya. Ekstrak bakteri kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri patogen. Seluruh data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik dan disusun dalam laporan penelitian.

Alur penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:



Gambar 3. 3 Alur penelitian  
(Dokumentasi Pribadi, 2024)