

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode deskriptif dan ekperimental dengan pendekatan 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. Penelitian ini mendeskripsikan karakteristik serta jumlah bakteri endofit dari akar *Clitoria ternatea* yang berhasil diisolasi dan tumbuh pada media. Sedangkan penelitian eksperimental bertujuan untuk mengetahui bagaimana perlakuan tertentu terhadap sesuatu dalam kondisi yang terkendalikan. Penelitian eksperimental meliputi perlakuan ekstrak supernatan bakteri endofit potensial akar *C. ternatea* yang dibuat menjadi beberapa seri konsentrasi untuk dilakukan uji aktivitas antibakteri

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) mulai dari bulan Januari 2025 hingga April 2025.

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan penelitian yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA B UPI, dan Laboratorium Mikrobiologi JICA, FPMIPA. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam **Lampiran 1**.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Persiapan Alat dan Media Penelitian

Pada tahap ini dilakukan persiapan alat serta bahan yang meliputi penghitungan kebutuhan alat dan bahan, memastikan ketersediaan alat dan bahan,

pembuatan stok media dan reagen (**Lampiran 2**). Media yang digunakan diantaranya *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), dan MHB (*Mueller Hinton Broth*). Kemudian semua alat dan medium yang sudah dipersiapkan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan metode sterilisasi basah yaitu dengan menempatkan alat dan medium penelitian pada autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 atm (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.4.2. Pengambilan Sampel

Akar tanaman bunga telang diperoleh dari tanaman bunga telang dewasa yang ada disalah satu pekarangan rumah yang ada di daerah Gegerkalong, KPAD, Kota Bandung. Bagian akar yang diambil adalah akar utamanya dengan panjang potongan sekitar 10 cm. Usia tanaman bunga telang sekitar 3-4 bulan dengan inang yang telah memiliki bunga (Reformasintansari dkk., 2021). Selain pengambilan sampel, dilakukan juga pengukuran faktor klimatik yang mencakup ketinggian tempat, suhu udara, kelembaban udara dan intensitas cahaya pada lokasi pencuplikan sampel.

3.4.3. Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit

Akar utama bunga telang dibersihkan dengan air mengalir selama 15 menit. Sampel akar kemudian direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, larutan natrium hipoklorit 5.25 % selama 5 menit, kembali direndam alkohol 70% selama 1 menit dan terakhir dibilas kembali dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu, sampel akar yang telah steril dipotong-potong kecil. Potongan sampel kemudian ditanam secara steril di dalam media NA steril yang telah mengandung nistatin (Sartika dkk., 2023). Isolasi bakteri dilakukan dengan teknik *direct planting*, yaitu dengan meletakkan potongan akar tanaman yang sudah kering di atas permukaan NA, Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Adityawarman dkk., 2019). Sebagai kontrol keberhasilan, aquades steril pada bilasan terakhir diambil sebanyak 100 µL dan disebar pada media NA dengan metode *spread plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jika ditemukan pertumbuhan bakteri pada media NA kontrol, maka dalam proses sterilisasi akar masih terdapat kontaminasi oleh bakteri yang ada di permukaan akar. Selanjutnya dilakukan

pemurnian dengan mengambil satu ose koloni bakteri endofit yang tumbuh pada media dan diinokulasikan ke media NA miring hingga menjadi isolat murni.

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

Sebelum uji aktivitas antibakteri, bakteri uji terlebih dahulu dibiakkan pada agar miring steril kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang telah dibiakkan pada agar miring diambil menggunakan ose dan diinokulasikan ke tabung reaksi baru yang berisi 5 ml larutan NaCl 0,9% steril kemudian dihomogenkan dengan *vortex* (Misna & Diana, 2016). Kemudian, 100 µl suspensi bakteri uji ditambahkan ke dalam 10 ml medium NB dan diinkubasi di *shaker* inkubator dengan kecepatan *shaker* 120 rpm sampai bakteri uji mencapai fase stasioner (Hudaya dkk., 2014).

Metode uji antagonis mengacu pada penelitian Widowati dkk. (2019), yaitu dengan memasukan 1 ml suspensi inokulum bakteri uji dan 9 ml medium MHA yang sudah hangat kuku ke dalam cawan petri steril. Suspensi bakteri uji dan medium MHA dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Metode inokulasi titik dilakukan dengan cara mengambil satu ose dari masing-masing isolat bakteri endofit untuk diinokulasikan ke atas campuran suspensi bakteri uji dan medium MHB cair, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Potensi isolat bakteri endofit untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekeliling isolat bakteri endofit (Zuraidah dkk., 2020).

3.4.5. Identifikasi Isolat Bakteri Endofit Potensial

Setelah didapatkan bakteri isolat potensial yang positif terhadap uji antagonis, bakteri selanjutnya diidentifikasi lebih lanjut secara mikroskopis dan makroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan melalui kenampakan morfologi koloni yang terbentuk dari isolat, meliputi warna koloni, bentuk koloni, tepian koloni, elevasi dan tekstur koloni. Identifikasi mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Ninth Edition* (Bergey, 1994).

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Pewarnaan sel bakteri mengacu pada (Cappuccino & Welsh, 2018) yaitu dilakukan dengan menggunakan empat pewarna berbeda. Pertama dibuat apusan bakteri di atas kaca objek dan dilakukan fiksasi dengan dilewatkan di atas api.

Perlahan-lahan ditetesi/warnai dengan kristal violet lalu dibiarkan selama satu menit. Selanjutnya dilakukan pembilasan menggunakan akuades steril secara perlahan-lahan untuk membuang kelebihan warna. Setelah itu sediaan ditetesi oleh iodine secara perlahan lalu biarkan selama satu menit lalu dibilas kembali menggunakan akuades steril. Selanjutnya secara perlahan dibilas menggunakan alkohol 95% selama 30 detik untuk dekolorisasi lalu dibilas kembali dengan akuades steril. Tahap pewarnaan terakhir yaitu ditetesi dengan safranin dan dibiarkan selama 45 detik lalu dibilas menggunakan akuades steril secara perlahan dan kemudian dikeringkan menggunakan kertas bilbulus. Sediaan lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Bakteri yang tergolong ke dalam Gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Cappuccino & Welsh, 2018).

Pewarnaan endospora dimulai dengan meneteskan pewarna malakit hijau pada isolat bakteri. Proses ini dilakukan dengan memanaskan sediaan bakteri di atas gelas kimia yang berisi air pada *hot plate* selama tiga menit. Setelah itu, sediaan dikeringkan dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian, pewarna safranin ditambahkan ke sediaan dan dibiarkan selama 30 detik sebelum dibilas dengan air. Selanjutnya, sediaan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Sel vegetatif akan berwarna merah akibat penyerapan dari pewarna safranin, sementara endospora akan tetap berwarna hijau karena mengikat pewarna malakit hijau (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.4.6. Uji Aktivitas Biokimia Isolat Bakteri Endofit Potensial

Uji aktivitas biokimia digunakan sebagai salah satu langkah identifikasi bakteri berdasarkan aktivitas biokimianya. Uji ini memanfaatkan karakteristik alami bakteri yang berbeda dalam melakukan aktivitas biokimia (Kantari & Ariyanti, 2024). Metode dalam uji aktivitas biokimia mengacu pada prosedur oleh Cappuccino & Welsh (2018).

1. Uji Hidrolisis Pati

Uji hidrolisis pati dilakukan pada medium agar pati. Medium ini digunakan untuk mengetahui aktivitas bakteri dalam menghidrolisis pati. Pertama-tama medium agar pati ditimbang dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* di

atas *hot plate*. Setelah itu, medium yang telah homogen didinginkan hingga hangat kuku dan dituangkan ke cawan petri steril. Setelah medium dingin, bakteri isolat di- *streak* ke atas medium pati dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi 24 jam, larutan lugol dituangkan ke atas medium yang berisi *streak* bakteri tadi dan dibiarkan selama beberapa menit hingga medium berubah agak kehitaman. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar *streak* bakteri (Cappuccino & Welsh, 2018).

2. Uji Hidrolisis Lipid

Uji hidrolisis lipid dilakukan pada medium lipid. Media pembuatan lipid ditimbang dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Setelah homogen, medium dibiarkan hingga hangat kuku dan kemudian dituangkan ke cawan petri steril. Setelah medium dingin, masing-masing isolat bakteri endofit di *streak* ke atas medium lipid dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, akan terlihat hasil aktivitas bakteri dalam menghidrolisis lipid. Hasil positif ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni atau adanya perubahan medium menjadi warna merah pada bagian bawah bakteri (Cappuccino & Welsh, 2018).

3. Uji Hidrolisis Kasein

Uji hidrolisis kasein dilakukan pada medium susu skim. Seluruh media pembuatan susu skim ditimbang dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Setelah homogen, medium dibiarkan hingga hangat kuku dan selanjutnya dituangkan pada cawan petri steril. Setelah medium dingin, bakteri diinokulasikan *streak* ke atas medium susu skim dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, pertumbuhan bakteri diamati. Hasil positif uji hidrolisis kasein ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Welsh, 2018).

4. Uji Hidrolisis Gelatin

Uji hidrolisis gelatin dilakukan dengan medium gelatin agar. Media pembuatan gelatin ditimbang dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Setelah homogen, medium yang sudah hangat kuku dituang ke dalam tabung reaksi. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium dengan jarum

ose dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, isolat disimpan pada kulkas suhu 4°C selama 30 menit. Hasil positif uji hidrolisis gelatin ditandai dengan media yang tetap cair (Cappuccino & Welsh, 2018).

5. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan pada tabung reaksi yang berisi medium Laktosa, Sukrosa dan Dekstrosa. Masing-masing media ditimbang dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Tiap tabung reaksi diisi dengan tabung durham. Isolat bakteri diinokulasikan ke medium dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, perubahan pada media diamati. Hasil positif uji ini adalah perubahan warna medium dari warna jingga menjadi warna kuning cerah dan ada tidaknya gelembung udara yang terbentuk pada tabung durham. Kedua maupun salah satu indikator tersebut menunjukkan hasil yang positif (Cappuccino & Welsh, 2018).

6. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan membuat sediaan isolat bakteri pada *Object glass*. Sediaan kemudian ditetaskan dengan H₂O₂ 3% sebanyak 1-2 kali. Hasil positif uji katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung udara yang menandakan diproduksinya gas O₂ hasil reduksi H₂O₂ dengan enzim katalase (Cappuccino & Welsh, 2018).

7. Uji Susu Litmus

Uji susu litmus dilakukan pada media susu litmus. Media pembuatan susu litmus ditimbang dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, hasil yang muncul beragam, dapat berupa perubahan warna menjadi merah muda, dihasilkan dadih (*curd*), dihasilkan gas, dan perubahan media menjadi warna coklat (Cappuccino & Welsh, 2018).

8. Uji Produksi H₂S dan Motilitas

Uji produksi H₂S dilakukan dengan menusukan isolat bakteri endofit menggunakan jarum ose ke dalam medium SIM agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, akan terlihat perubahan warna pada medium

menjadi hitam yang menandakan bahwa isolat mampu memproduksi H₂S. Selain untuk mengetahui aktivitas bakteri dalam produksi H₂S, uji ini juga digunakan untuk mengetahui motilitas bakteri. Hasil positif uji motilitas ditandai dengan adanya persebaran bakteri pada medium sehingga medium tampak keruh (Cappuccino & Welsh, 2018).

9. Uji IMViC

a) Uji Indol

Uji indol dilakukan pada media SIM yang diinokulasikan bakteri menggunakan ose. Kemudian medium yang telah diinokulasikan diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, 10 tetes pereaksi *Kovac's* (dimetil aminobenzaldehid, n-amyl alkohol, dan HClp) ditambahkan pada medium tadi. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan medium (Cappuccino & Welsh, 2018).

b) Uji *Methyl Red*

Uji *methyl red* dilakukan pada media *Methyl RedVoges Proskauer* (MR-VP) yang telah diinokulasikan dengan bakteri endofit. Kemudian medium yang telah diinokulasikan diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, 5 tetes reagen methyl red ditambahkan ke medium. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah (Cappuccino & Welsh, 2018).

c) Uji *Voges-Proskauer*

Uji *Voges-Proskauer* dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri ke dalam medium MR-VP. Kemudian medium yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, 10 tetes reagen *Barrit's A* dan *Barrit's B* ditambahkan ke dalam medium. Medium kemudian didiamkan selama 15-30 menit. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya cincin merah pada permukaan medium (Cappuccino & Welsh, 2018).

d) Uji *Sitrat (Simmon's Citrate)*

Uji sitrat dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium *Simmons' Citrate* agar. Kemudian medium yang telah diinokulasikan bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil ditandai dengan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru tua (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.4.7. Pembuatan Kurva Tumbuh Isolat Bakteri Endofit Potensial

Kurva tumbuh dibuat untuk mengetahui fase hidup bakteri yaitu fase *lag*, fase eksponensial, fase stasioner, dan kematian. Pembuatan kurva tumbuh bakteri dilakukan dengan metode turbidimetri, yaitu dengan mengukur turbiditas atau kekeruhan dari sampel kultur bakteri menggunakan nilai *Optical Density* (OD). Perhitungan nilai OD dilakukan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS.

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri dimulai dengan subkultur isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif dari uji antagonis sebelumnya (potensial). Sebanyak satu ose koloni bakteri potensial, diinokulasikan pada 10 ml medium NB dan diinkubasi selama 24 jam pada *shaker* inkubator suhu 37°C dengan kecepatan 121 rpm. Setelah 24 jam, sebanyak 1 ml kultur bakteri potensial dipindahkan ke dalam erlenmeyer baru berisi 100 ml medium NB kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 121 rpm untuk diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600 nm setiap interval waktu 1 jam selama 24 jam dengan masing-masing interval waktu dilakukan 2 kali pengulangan (Cappuccino & Welsh, 2018). Kurva pertumbuhan bakteri diambil dari data pengukuran nilai absorbansi; sumbu x menunjukkan interval waktu observasi dan sumbu y menunjukkan nilai absorbansi (Pourramezan dkk., 2021).

3.4.8. Ekstraksi Supernatan (Metabolit Sekunder) Isolat Bakteri Endofit

Proses ekstraksi metabolit sekunder mengacu pada metode Uche-Okereafor dkk., (2019). Satu ose isolat bakteri potensial diinokulasi pada 250 ml medium NB steril dalam tabung *Erlenmeyer* 500 ml, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 37°C dan kecepatan 121 rpm hingga mencapai fase stasioner sesuai kurva tumbuh isolat bakteri. Kemudian kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam corong pisah kemudian diekstraksi menggunakan etil asetat dengan rasio 1:1 dan dihomogenkan dengan cara dikocok selama 5-10 menit hingga terbentuk lapisan organik (etil asetat). Lapisan organik tersebut dipisahkan dengan lapisan lainnya yang tidak larut oleh etil asetat, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kasar (Uche-Okereafor dkk., 2019). Ekstrak kasar kemudian dilarutkan pada *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)

Chersa Steffany Polandos, 2025

ISOLASI BAKTERI ENDOFIT AKAR BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L.) DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

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

10% sebagai stok dan diencerkan dalam seri konsentrasi 2,5 mg/mL, 10 mg/mL dan 40 mg/mL (Makuwa & Serepa-Dlamini, 2021). Setelah itu dilanjutkan dengan uji terhadap bakteri patogen menggunakan metode DDA.

3.4.9. Uji *Disk Diffusion Assay* (DDA)

Hasil ekstraksi dengan seri konsentrasi yang telah ditentukan, masing-masing dilakukan uji potensi antibakterinya dengan menggunakan metode kertas cakram (*Disk Diffusion Assay*) dengan masing-masing konsentrasi dilakukan 2 kali pengulangan. Sebanyak 150 μ L suspensi bakteri uji dimasukkan pada cawan petri, lalu ditambahkan media MHA cair yang masih hangat kuku dengan metode *pour plate* dan dihomogenkan.

Kertas cakram kosong dengan diameter 6 mm diletakkan di atas media MHA yang mengandung suspensi bakteri uji menggunakan pinset secara aseptik, kemudian tiap seri konsentrasi ekstrak (2,5 mg/mL, 10 mg/mL, dan 40 mg/mL) diteteskan sebanyak 10 μ L ke atas masing-masing cakram. Kontrol yang digunakan dalam uji aktivitas bakteri yaitu DMSO 10% sebagai kontrol negatif dan antibiotik kloramfenikol 30 mg/mL sebagai kontrol positif (Nugraha dkk., 2023). Kemudian cawan petri di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Astari dkk., 2021). Setelah inkubasi, dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang muncul dari tiap perlakuan. Pengukuran zona hambat mengikuti rumus:

$$\text{Zona Hambat} = \frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$$

Keterangan:

DV : Diameter vertikal zona bening

DC : Diameter cakram

DH : Diameter horizontal zona bening

Diameter zona yang terbentuk kemudian dikelompokkan berdasarkan pengelompokan zona hambat oleh Davis & Stout, (1971) dalam Nabilla & Advinda, (2022) mengelompokkan kekuatan daya antibakteri menjadi empat kategori berdasarkan besar zona hambat yang terbentuk yang dapat dilihat pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1. Kategori Zona Hambat

Besar Zona Hambat	Kategori
≤5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
≥20 mm	Sangat kuat

3.4.10. Penentuan Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Penentuan nilai MIC dilakukan menggunakan metode *two-fold serial broth microdillution*. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) merupakan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Pourramezan dkk., 2021b). Uji MIC dilakukan dengan membagi pelat mikrotiter 96 sumur menjadi tiga zona, yaitu kontrol negatif, perlakuan, dan kontrol positif.

Sumur ke-1 diisikan kontrol positif yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl kloramfenikol untuk masing-masing bakteri uji (*S. aureus* dan *E. coli*). Sumur ke-2 diisikan kontrol negatif yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl DMSO 10%. Untuk sumur ke-3 sampai ke-12 diisikan perlakuan. Perlakuan yang digunakan yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl ekstrak supernatan isolat bakteri endofit dengan berbagai konsentrasi. Seri konsentrasi ekstrak supernatan bakteri dari sumur 3 sampai sumur 12 berturut-turut yaitu; 0,078 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, dan 40 mg/mL.

Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 100 µL DMSO 10% ke dalam tiap sumur perlakuan, yaitu sumur ke-3 hingga sumur ke-11. Ekstrak supernatan dengan konsentrasi 40,0 mg/mL ditambahkan ke dalam sumur ke-12 sebanyak 200 µL. Setelah itu, 100 µL ekstrak supernatan diambil dari sumur ke-12 dan dipindahkan ke sumur ke-11, kemudian dihomogenkan. Proses ini diulangi hingga mencapai sumur ke-3, lalu diambil ekstrak supernatan dari sumur ke-3 sebanyak 100 µL kemudian dibuang. Setelah itu, 100 µL inokulum mikroba uji ditambahkan ke dalam sumur ke-3 hingga sumur ke-12. Setiap perlakuan ekstrak diulang dua kali, dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C (Nxumalo dkk., 2020).

Nilai MIC ditentukan berdasarkan pengamatan konsentrasi ekstrak paling kecil yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri, yang diindikasikan dengan larutan yang terlihat jernih (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Skema uji MIC dijelaskan pada Tabel 3.2 Selain pengamatan berdasarkan kejernihan larutan yang terlihat, dilakukan juga pengamatan nilai OD menggunakan spektrofotometer UV-VIS berdasarkan hasil uji MIC.

Uji MBC dilakukan menggunakan metode lempeng agar yang merujuk pada penelitian Nxumalo dkk., (2020) dengan menginokulasikan 100 µl dari empat sumur terdekat dari konsentrasi terendah yang menunjukkan hasil positif uji MIC ke dalam medium MHA lalu masing-masing medium dengan konsentrasi berbeda diinkubasi 24 jam di suhu 37°C (Uche-Okerefor dkk., 2019). Nilai MBC ditentukan berdasarkan nilai konsentrasi terendah, yaitu ketika tidak lagi terjadi pertumbuhan bakteri (Liu dkk., 2024). MBC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari suatu agen antimikroba yang mampu membunuh bakteri secara efektif, yaitu pada konsentrasi di mana tidak terdapat lagi pertumbuhan koloni bakteri setelah dilakukan subkultur pada media yang bebas agen antimikroba. Rancangan lempeng MIC dapat dilihat pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3.2. Rancangan Lempeng MIC

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		Kontrol (+)	Kontrol (-)	0,078	0,156	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	
A	A6.1													
B	A6.2													
C	A7.1													
D	A7.2													
E	A14.1													
F	A14.2													
G	dst..													
H	dst..													

3.4.11. Kurva *Time Kill Assay*

Metode yang digunakan untuk *Time-Kill* dalam penelitian ini merupakan hasil modifikasi dari penelitian Israyilova dkk., (2022). Sebanyak 10 mL MHB ditambahkan dengan konsentrasi ekstrak supernatan yang berbeda yaitu 0xMIC,

Chersa Steffany Polandos, 2025

ISOLASI BAKTERI ENDOFIT AKAR BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea L.*) DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

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

1xMIC, 2xMIC dan 4xMIC. Sebanyak 10 mL MHB tanpa penambahan ekstrak dibuat untuk digunakan sebagai kontrol negatif pertumbuhan bakteri uji. Lalu, sebanyak 2 ml inokulum bakteri uji yang sudah setara dengan standar McFarland 0,5% (CLSI, 1999) untuk dimasukkan kedalam masing-masing perlakuan. Tabung eppendorf 1,5 ml disiapkan dan diisi dengan 900 μ L larutan DMSO 10% untuk nantinya digunakan sebagai media pengenceran. Sampel dari tiap konsentrasi MIC dicuplik pada tiap interval waktu yang berbeda (0, 4, 8, 12, dan 24 jam) untuk dilakukan pengenceran (CLSI, 1999., Koeth, 2023). Tiap perlakuan dilakukan perhitung andengan metode drop-plate yaitu dengan meneteskan 10 μ L sampel sebanyak 10 kali di atas media MHA sesuai dengan waktu cuplik sampel. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada media dihitung dan ditentukan jumlah bakteri (CFU/ml). Setiap perlakuan dilakukan dalam dua kali ulangan dan dihitung rata-ratanya. Kurva ditentukan berdasarkan jumlah koloni bakteri dalam satuan CFU/mL (sumbu Y) dan waktu pengambilan sampel dalam satuan jam (sumbu X).

3.5. Analisis Statistik

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan program SPSS 22. Data yang dianalisis ialah data hasil pengukuran diameter zona hambat dari uji aktivitas antibakteri. Jenis analisis data yang dilakukan diantaranya:

3.5.1. Uji Normalitas

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

3.5.2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas masing-masing dilakukan pada kelompok perlakuan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, menggunakan uji *Levene* dengan taraf kepercayaan sebesar 95%. Variansi data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik dapat diketahui. Uji statistik parametrik dapat dilakukan apabila sebaran

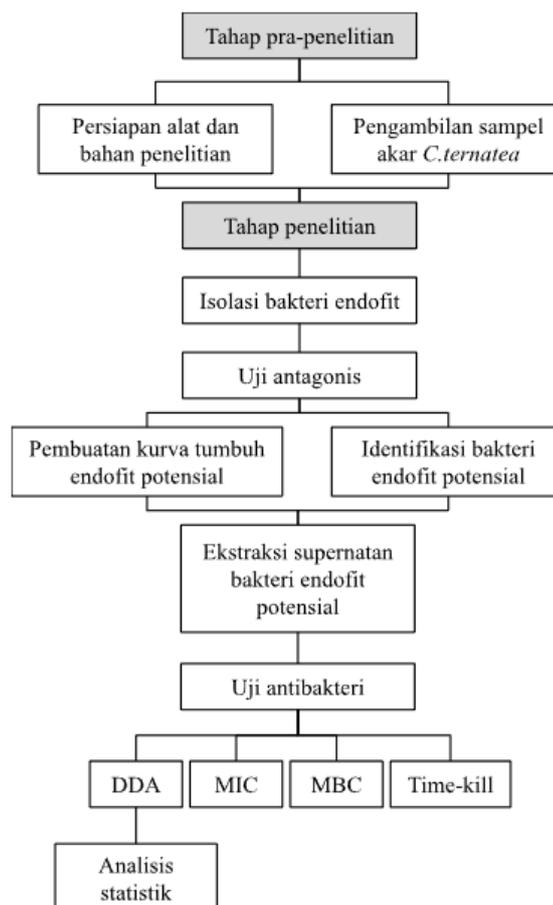
data normal dan homogen. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka dilakukan uji statistik non parametrik.

3.5.3. Uji *One 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 *one ways Anova* dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perbedaan konsentrasi supernatan dan isolat bakteri terhadap diameter zona hambat bakteri uji.

3.6. Alur Penelitian

Alur penelitian Isolasi Bakteri Endofit Akar Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) dan Potensi Antibakterinya terhadap Bakteri Patogen dapat dilihat pada **Gambar 3.1** berikut.



Gambar 3.1. Alur Penelitian