

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis 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. Penelitian ini mendeskripsikan karakteristik serta jumlah bakteri endofit daun *C.ternatea* yang berhasil diisolasi dan tumbuh pada media. Sedangkan, pada penelitian ini metode ekperimental meliputi perlakuan ekstrak supernatan bakteri endofit daun *C.ternatea* yang dibuat menjadi beberapa seri konsentrasi untuk dilakukan uji aktivitas antibakteri.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

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

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

Alat serta bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA B dan Laboratorium Mikrobiologi JICA, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia. Detail alat dan bahan dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Persiapan Alat dan Media Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan, pada tahap ini terlebih dahulu dilakukan persiapan alat serta bahan yang akan digunakan. meliputi penghitungan kebutuhan alat dan bahan, memastikan ketersediaan alat dan bahan, pembuatan stok media dan reagen. Media yang digunakan diantaranya *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), dan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kemudian semua alat dan medium yang sudah dipersiapkan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan metode

sterilisasi basah yaitu menempatkan alat dan medium pada *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 atm (Cappuccino, 2019).

3.4.2. Pengambilan Sampel Daun *C.ternatea*

Daun tanaman *C.ternatea* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari salah satu pekarangan rumah yang ada di Jl. Padaringan, KPAD (Komisi Perlindungan Anak Daerah) di Kecamatan Suka Sari, Kota Bandung. Tanaman *C.ternatea* yang berumur 3-4 bulan dan sudah memiliki bunga diambil bagian daun mudanya (daun ke-3 sampai ke-5) untuk kemudian akan disterilisasi dan diisolasi bakteri endofitnya pada media NA. Selain dilakukannya pengambilan sampel, pengamatan klimatik dan edafik lingkungan sekitar tanaman *C.ternatea* tumbuh juga dilakukan. Pengamatan yang diamati mencakup ketinggian tempat, suhu udara, kelembaban udara, intensitas cahaya, pH tanah dan suhu tanah pada lokasi pencuplikan sampel.

3.4.3. Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit dari Daun *C.ternatea*

Sampel daun *C.ternatea* dalam keadaan segar dibersihkan dengan air mengalir selama kurang lebih 15 menit. Lalu, sampel daun direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 5.25 % selama 5 menit, kembali direndam dengan alkohol 70% 1 menit, dan dibilas kembali dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu, sampel daun yang sudah steril dipotong-potong dengan ukuran 1x1 cm. Isolasi bakteri ini dilakukan dengan teknik *direct planting*, yaitu dengan meletakkan potongan daun yang sudah steril dan kering ke atas permukaan NA. Potongan sampel yang sudah dipotong-potong secara steril kemudian ditanam dalam media NA yang mengandung nistatin lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Sebagai kontrol keberhasilan, 100 µl aquades steril pada bilasan terakhir diambil dan disebar pada media NA dengan menggunakan metode *spread plate*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jika setelah diinkubasi ditemukan pertumbuhan bakteri pada media kontrol, maka masih terdapat kontaminasi oleh bakteri permukaan daun (Adityawarman dkk., 2019). Bakteri endofit daun yang berhasil tumbuh pada permukaan media NA selanjutnya dimurnikan dengan cara mengambil satu koloni bakteri endofit pada media dan diinokulasikan ke media NA miring sebagai stok isolat murni.

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

Sebelum dilakukannya uji antagonis isolat. Bakteri uji yaitu *S.aureus* dan *E.coli* diremajakan pada agar miring steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang telah dibiakkan pada agar miring diambil dengan menggunakan ose dan diinokulasikan kedalam tabung reaksi yang berisikan 5 ml larutan NaCl 0,9% steril dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* (Misna & Diana, 2016). Kemudian 100 µl suspensi bakteri uji ditambahkan ke dalam 10 ml media NB dan diinkubasi di *shaker* inkubator dengan kecepatan 120 rpm sampai bakteri uji mencapai fase stasioner (Hudaya dkk., 2014).

Uji antagonis pada penelitian ini dilakukan berdasarkan metode Widowati, (2013) yaitu memasukan 1 ml suspensi inokulum bakteri uji dan 9 ml medium MHA yang sudah hangat kuku kedalam cawan petri steril. Suspensi bakteri uji dan medium MHA agar dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Metode inokulasi titik dilakukan dengan cara mengambil satu ose dari masing-masing isolat bakteri endofit untuk diinokulasikan di atas campuran suspensi bakteri uji dan medium MHA, lalu 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 (Zuraidah dkk., 2020).

3.4.5. Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Potensial

Isolat bakteri endofit potensial yang didapatkan dari hasil uji antagonis selanjutnya diidentifikasi, Identifikasi bakteri endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis (Rihadatul dkk., 2023). Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi koloni isolat yang meliputi pengamatan warna, bentuk, tepian, elevasi, dan tekstur koloni. Proses identifikasi makroskopis ini mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* edisi kesembilan (Bergey, 1994). Sementara itu, pengamatan mikroskopis yang dilakukan pada penelitian ini meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan pengamatan bentuk sel yang semuanya diamati di bawah mikroskop. Prosedur pewarnaan Gram pada penelitian ini mengikuti prosedur Cappuccino & Welsh, (2018).

Untuk pengamatan mikroskopis, pertama apusan bakteri dibuat di atas kaca objek dan dilakukan fiksasi dengan dilewatkan di atas api. Lalu preparat ditetesi dengan kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan

Chersy Tiffany Polandos, 2025

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

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

pembilasan menggunakan akuades steril untuk membuang kelebihan warna. Setelah itu sediaan ditetesi oleh iodin secara perlahan lalu biarkan selama 1 menit lalu dibilas kembali menggunakan akuades steril. Selanjutnya secara perlahan dibilas menggunakan alkohol 95% selama 30 detik untuk dekolorisasi lalu dibilas kembali menggunakan 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.

Sedangkan untuk pewarnaan endospora, sediaan mikroskopik isolat bakteri ditetesi dengan pewarna malakit hijau. Tahapan ini dilakukan di atas gelas kimia berisi air yang dipanaskan selama tiga menit di atas *hot plate*. Sediaan kemudian didinginkan sebelum pembilasan dengan air mengalir. Setelah itu, safranin ditambahkan pada sediaan dan didiamkan selama 30 detik sebelum dibilas dengan air. Selanjutnya, sediaan diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000 kali. Sel vegetatif yang teramati akan tampak berwarna merah, sedangkan endospora akan mengikat warna hijau dari malakit hijau (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.4.6. Uji Aktivitas Biokimia Isolat Bakteri Endofit Potensial

Setiap bakteri memiliki karakteristik biokimia yang berbeda, sehingga uji aktivitas biokimia digunakan untuk mengidentifikasinya. Uji biokimia pada penelitian ini mengacu pada metode Cappuccino & Welsh (2018).

1. Uji Hidrolisis Pati

Isolat bakteri endofit potensial diinokulasikan pada cawan petri steril yang berisi medium agar pati dalam cawan petri steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah pertumbuhan bakteri teramati, larutan lugol ditetaskan ke atas medium pati yang telah diinokulasi, kemudian didiamkan selama beberapa menit. Indikasi positif dari uji hidrolisis pati oleh enzim amilase ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri (Cappuccino & Welsh, 2018).

2. Uji Hidrolisis Lipid

Isolat bakteri endofit potensial diinokulasikan pada cawan petri steril yang berisi medium agar lipid, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Indikasi positif dari uji hidrolisis lipid ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni atau perubahan warna medium yang mengandung indikator *neutral red* menjadi merah pada bagian bawah koloni bakteri (Cappuccino & Welsh, 2018).

3. Uji Hidrolisis Kasein

Isolat bakteri diinokulasikan pada cawan petri steril yang berisi medium susu skim agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Indikasi positif hidrolisis kasein ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekitar pertumbuhan bakteri (Cappuccino & Welsh, 2018).

4. Uji Hidrolisis Gelatin

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium gelatin cair, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum disimpan pada suhu 4°C selama 30 menit. Jika medium tetap dalam keadaan cair setelah pendinginan, maka hasil uji dapat dikatakan positif (Cappuccino & Welsh, 2018).

5. Uji Fermentasi Karbohidrat

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium NB fenol merah yang mengandung gula, seperti dekstroksa, sukrosa atau laktosa. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium dari jingga menjadi kuning, yang mengindikasikan produksi asam, serta keberadaan gelembung udara dalam tabung durham, yang menunjukkan pembentukan gas CO₂ sebagai hasil fermentasi (Cappuccino & Welsh, 2018).

6. Uji Katalase

Isolat bakteri dibuat dalam bentuk sediaan pada kaca objek dengan ose steril, kemudian ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%. Indikasi positif ditunjukkan oleh munculnya gelembung udara, yang menandakan bahwa enzim katalase telah mengkatalisis dekomposisi hidrogen peroksida menjadi gas oksigen (O₂) dan air (Cappuccino & Welsh, 2018).

7. Uji Susu Litmus

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium susu litmus dan diinkubasi selama pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji dapat menunjukkan berbagai reaksi, seperti pembentukan asam yang ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah muda, produksi gas, pembentukan dadih (*curd*), peningkatan alkalinitas yang menyebabkan medium berwarna ungu atau biru, serta reaksi proteolisis yang ditunjukkan dengan perubahan warna medium menjadi coklat (Cappuccino & Welsh, 2018).

8. Uji Produksi H₂S dan Motilitas

Isolat bakteri diinokulasikan dengan jarum ose ke dalam tabung reaksi yang berisi medium SIM agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi hitam, yang mengindikasikan produksi hidrogen sulfida. Selain itu, uji ini juga dapat digunakan untuk menilai motilitas bakteri. Bakteri motil akan tumbuh menyebar sehingga medium tampak keruh, sedangkan bakteri non-motil hanya tumbuh pada jalur inokulasi (Cappuccino & Welsh, 2018).

9. *IMVIC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, and Citrate) Tests*

a. Uji Indol

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium SIM agar menggunakan jarum ose, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, medium ditambahkan reagen *Kovac's*. Indikasi positif uji ini adalah terbentuk cincin merah pada permukaan medium (Cappuccino & Welsh, 2018).

b. *Methyl Red* dan *Voges-Proskauer* (MR-VP)

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam dua tabung medium MR-VP broth, masing-masing diberi label "MR" untuk uji *Methyl Red* dan "VP" untuk uji *Voges-Proskauer*. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif pada uji *Methyl Red* ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah setelah ditetesi reagen *methyl red*, sedangkan hasil positif uji *Voges-Proskauer* ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi merah atau merah muda setelah penambahan 10 tetes reagen Barrit A dan B (Cappuccino & Welsh, 2018).

c. Uji Sitrat

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium *Simmons Citrate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Perubahan warna medium dari hijau menjadi biru tua menandakan hasil positif (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.4.7. Pembuatan Kurva Tumbuh Isolat Bakteri Endofit Potensial

Pembuatan kurva tumbuh bakteri ini dilakukan dengan metode turbidimetri dengan cara mengukur turbiditas atau kekeruhan dari sampel kultur bakteri menggunakan nilai *Optical Density* (OD). Pengukuran OD dilakukan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS.

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri dimulai dengan subkultur isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif terhadap uji antagonis. Sebanyak satu ose koloni bakteri potensial, diinokulasikan pada erlenmeyer yang berisikan 10 ml medium NB dan diinkubasi selama 24 jam pada *shaker* inkubator pada suhu 37°C dengan kecepatan 121 rpm. Setelah 24 jam, sebanyak 1 ml kultur bakteri potensial di ambil dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer baru yang berisikan 100 ml medium NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 121 rpm dan diukur turbiditasnya 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 dari Kultur Isolat Bakteri Endofit

Isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif pada uji antagonis diambil menggunakan ose dan kemudian dimasukkan pada medium cair 250 ml NB steril dalam erlenmeyer 500 ml. Setelah itu kultur bakteri diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan suhu 37°C dengan kecepatan 121 rpm hingga mencapai fase awal stasioner sesuai kurva tumbuh isolat bakteri. Kemudian kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Astari dkk., 2021b). Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan dipindahkan ke dalam corong pisah untuk kemudian diekstraksi menggunakan etil asetat dengan rasio 1:1 dan dihomogenkan dengan cara dikocok selama 5-10 menit hingga terbentuk lapisan organik (etil asetat).

Selanjutnya, lapisan organik tersebut dipisahkan dengan lapisan lainnya yang tidak larut dalam etil asetat, lalu dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kasar (Uche-Okerefor dkk., 2019). Ekstrak kasar yang didapatkan kemudian dilarutkan pada *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 10% sebagai stok lalu diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi 2,5 mg/mL, 10,0 mg/mL, dan 40,0 mg/mL (Makuwa & Serepa-Dlamini, 2021).

3.4.9. Uji DDA Ekstrak Supernatan Isolat Bakteri Endofit

Hasil ekstraksi dengan berbagai seri konsentrasi yang sudah ditentukan dilakukan uji potensi antibakterinya dengan menggunakan metode kertas cakram (*Disk Diffusion Assay*) dengan masing-masing konsentrasi dilakukan 2 kali ulangan. Sebanyak 150 µL suspensi bakteri uji dimasukkan pada cawan petri steril, lalu ditambahkan media MHA cair yang masih hangat kuku kedalam cawan petri tersebut dengan metode *pour plate* dan dihomogenkan. Kertas cakram steril dengan diameter 6 mm diletakkan diatas media MHA yang mengandung suspensi bakteri uji menggunakan pinset secara aseptik. Kemudian tiap seri konsentrasi ekstrak supernatan yaitu 2,5 mg/mL, 10,0 mg/mL, dan 40,0 mg/mL diteteskan sebanyak 10 µL ke atas kertas cakram. Digunakan juga kontrol positif dan negatif sebagai indikator, kontrol positif menggunakan antibiotik Kloramfenikol 30 mg/mL (Nugraha dkk., 2023). Sedangkan untuk kontrol negatif digunakan larutan DMSO 10% untuk memastikan bahwa pelarut ekstrak supernatan bakteri endofit potensial yang digunakan tidak memengaruhi hasil zona hambat yang terbentuk. Kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Muharni dkk., 2014; Astari dkk., 2021).

Setelah diinkubasi selama 24 jam, zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan :

DV : Diameter vertikal zona bening

DC : Diameter cakram

DH : Diameter horizontal zona bening

Chersy Tiffany Polandos, 2025

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

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

Setelah diameter zona hambat diukur berdasarkan rumus, Nilai diameter zona hambat yang terbentuk dikategorikan tingkat responnya berdasarkan penelitian (Davis & Stout, 1971) pada **Tabel 3.1.**

Tabel 3. 1. Zona Hambatan Pertumbuhan

Diameter Zona Hambatan	Respon hambatan pertumbuhan
≥20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah

3.4.10. Penentuan Nilai MIC dan MBC

Uji MIC dan MBC dilakukan menggunakan metode *two-fold serial broth microdilution*. Uji MIC dilakukan dengan membagi pelat mikrotiter 96 sumur menjadi tiga zona, yaitu, kontrol negatif, perlakuan dan kontrol positif (Pourramezan dkk., 2021). Pada sumur ke-1 diisikan kontrol positif yaitu 100 µl bakteri uji yang sudah setara dengan standar McFarland 0,5% ditambah 100 µl Kloramfenikol untuk masing-masing bakteri uji. Pada sumur yang ke-2 diisikan kontrol negatif yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl DMSO 10%. Sumur ke-3 sampai dengan sumur yang ke-12 diisikan perlakuan. Perlakuan yang digunakan yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl ekstrak supernatan bakteri endofit dengan berbagai konsentrasi. Seri konsentrasi ekstrak supernatan bakteri dari sumur 12 sampai sumur 3 berturut-turut; 40,0 mg/mL, 20,0 mg/mL, 10,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL, dan 0,078 mg/mL.

Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 100 µL DMSO 10% ke dalam tiap sumur perlakuan, yaitu sumur ke-3 sampai sumur ke-11. Ekstrak supernatan dengan konsentrasi 40,0 mg/mL ke dalam sumur ke-12 sebanyak 200 µL, kemudian 100 µL ekstrak supernatan diambil dari sumur ke-12 dan dipindahkan ke sumur ke-11, lalu dihomogenkan. Proses ini diulangi hingga mencapai sumur ke-3, lalu di sumur ke-3 sebanyak 100 µL 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). Selain dilakukan pengamatan berdasarkan kejernihan larutan yang terlihat, dilakukan juga pengamatan menggunakan spektrofotometer UV-VIS untuk menentukan nilai OD berdasarkan hasil uji MIC. Skema uji MIC dapat dilihat pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3. 2. Rancangan Lempeng *Minimum Inhibitory Concentration*

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

Uji MBC menggunakan metode lempeng agar menurut 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. Masing-masing medium yang berisi konsentrasi berbeda diinkubasi 24 jam di suhu 37°C. Nilai MBC didapatkan dari konsentrasi terendah yang tidak lagi terjadi pertumbuhan bakteri (Liu dkk., 2024). Nilai MBC yang didapatkan menunjukkan konsentrasi terendah dari ekstrak supernatan yang dapat membunuh 99% bakteri patogen.

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,

Chersy Tiffany Polandos, 2025

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

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 *ependorf* 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 perhitungan dengan 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 for windows. Data yang dianalisis merupakan 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

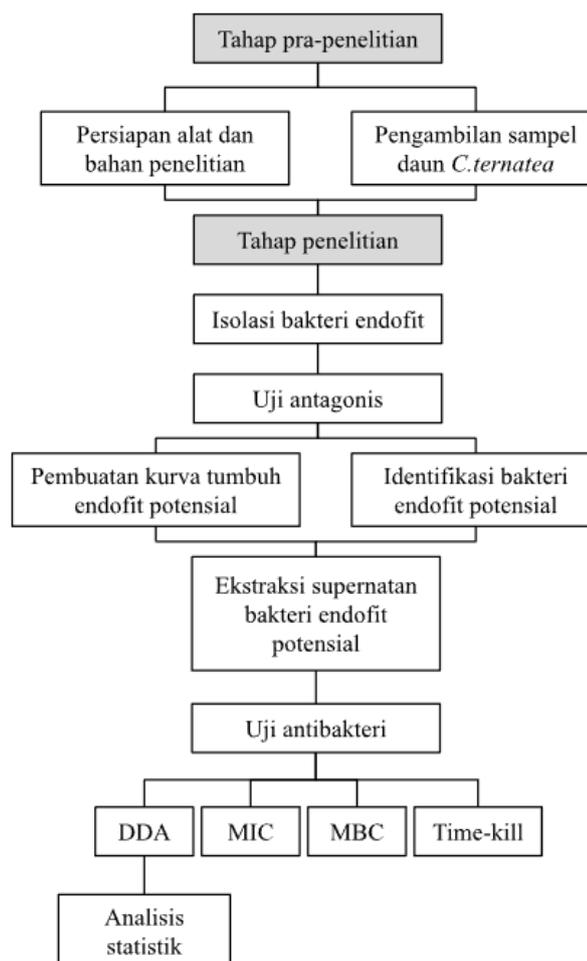
data normal dan homogen. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka dilakukan uji statistik non-parametrik.

3.5.3. Uji *One Way 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 Way 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 Aktivitas Antibakteri Endofit Daun Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3. 1. Diagram alur penelitian.