

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 11 November 2023 sampai tanggal 20 Desember 2023 di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi dan Laboratorium Analisis Instrumental, Universitas Setia Budi Surakarta, Solo, Jawa Tengah.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah kumpulan dari keseluruhan obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit dari bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) yang diperoleh di daerah Madegondo, Grogol, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah, pada tanggal 11 November 2023.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi yang akan digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit dari bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) yang memiliki aktivitas antioksidan, diambil acak dalam satu pohon, dengan ciri-ciri segar, mengkilap dan bebas penyakit atau noda kecoklatan maupun hama, berwarna merah muda, pengambilan pada tanggal 11 November 2023.

C. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah isolasi bakteri endofit yang terdapat pada bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) serta potensinya sebagai antioksidan.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini yaitu identifikasi ciri morfologi dari isolat bakteri endofit bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa*) yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu, variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu fermentasi bakteri endofit pada sampel daun dari bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.)

sebagai penghasil antioksidan.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan hasil fermentasi bakteri endofit pada sampel daun dari bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) yang dilihat dari pertumbuhan pada media uji dan daya hambat yang dihasilkan.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri endofit dari hasil fermentasi, sterilisasi tempat penelitian dan alat penelitian yang digunakan, kondisi peneliti, kondisi laboratorium penelitian meliputi, suhu inkubasi, waktu inkubasi, media yang digunakan dan metode penelitian.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) adalah bunga pukul empat yang diambil secara acak dalam satu pohon, dengan ciri-ciri segar, mengkilap dan bebas penyakit atau noda kecoklatan maupun hama, bunga yang dipilih berwarna merah muda yang diperoleh di daerah Madegondo, Grogol, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah.

Kedua, bakteri endofit adalah bakteri hidup didalam jaringan bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.), yang ditumbuhkan dalam media NA (*Nutrient* agar) setelah melalui proses sterilisasi permukaan untuk membunuh mikroorganisme luar, sehingga didapatkan bakteri endofit murni.

Ketiga, metabolit sekunder adalah hasil pemurnian pelet, setelah melalui proses fermentasi bakteri endofit dari bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.).

Keempat, aktivitas antioksidan adalah pengujian antioksidan yang dilakukan untuk menentukan nilai % inhibisi, IC₅₀, dan AAI dengan metode DPPH menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mortar dan stamper, *beaker glass*, autoklaf, inkubator, jarum ose, jarum L, kapas, cawan petri, pipet tetes, pipet volume, bunsen, pinset, vortex mixer, tabung reaksi, tabung sentrifugasi, rak tabung reaksi, timbangan analitik, spidol, mikroskop, *object glass*, *hot plate*, sentrifugator, koran atau kertas, pisau, botol kaca 150 ml, botol vial, labu ukur, kuvet, spektrofotometer UV-Vis.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri endofit yang diisolasi dan dimurnikan dari bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa*) yang memiliki senyawa antioksidan, serta diambil secara acak dalam satu pohon, segar, mengkilap dan bebas penyakit atau noda kecoklatan maupun hama, berwarna merah muda yang diperoleh dari Desa Madegondo, Kecamatan Grogol, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah, pada bulan Agustus tahun 2023.

Media uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media NA (*Nutrient agar*), media BHI (*Brain heart infusion*).

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian yaitu plasma kelinci, kristal violet, iodine, safranin, minyak mersei, garam amonium sulfat.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian yaitu larutan hidrogen peroksida, larutan NaOCl (*Sodium hypochlorite*), alkohol 70%, akuades steril, larutan gentian violet, lugol iodine, safranin, larutan DPPH, metanol *p.a.*, spiritus.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman Bunga Pukul Empat (*Mirabilis jalapa* L.)

Determinasi pada suatu tanaman berfungsi untuk memahami keaslian identitas tanaman yang digunakan, hal ini berpengaruh pada faktor pengambilan tanaman yang akan diuji diharapkan sesuai dengan apa yang diinginkan. Oleh karena itu kesalahan pada pengambilan dan pengumpulan bahan dapat dihindari peneliti.

Determinasi dari tanaman bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, dengan tujuan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan dan mendapatkan kepastian bahwa tanaman yang digunakan saat penelitian benar-benar tanaman bunga pukul empat dari genus *Mirabilis jalapa* L.

2. Pengambilan Tanaman Bunga Pukul Empat (*Mirabilis jalapa* L.)

Tanaman bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) didapat dari Madegondo, Grogol, Kabupaten Sukoharjo, Provinsi Jawa Tengah, pada bulan November tahun 2023. Tanaman bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) diambil dengan cara memetik bunga yang segar, bebas hama. Bunga yang dipakai yaitu berwarna merah muda untuk digunakan sebagai isolasi bakteri endofit serta potensi terhadap antioksidan penghasil senyawa kimia.

3. Sterilisasi Alat Dan Bahan

Sterilisasi dilakukan dengan tujuan untuk mencegah terjadinya kontaminasi mikroorganisme pada alat dan bahan. Alat-alat dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas lalu ditutup dengan kapas setelah itu dilakukan sterilisasi. Sterilisasi media yang akan digunakan di autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Putri dan Sukini, 2017), untuk sterilisasi alat berbahan gelas menggunakan oven suhu 180⁰C selama 60 menit (Saputera *et al.*, 2018).

4. Sterilisasi Sampel Bunga Pukul Empat (*Mirabilis jalapa*)

Sampel bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) dicuci dengan air yang mengalir terlebih dahulu, kemudian dilakukan proses sterilisasi permukaan. Sampel direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit lalu bilas dengan akuades steril, kemudian cairan perendam dibuang dan diganti dengan NaOCl (*Natrium hipoklorit*) 5,25% selama 5 menit, NaOCl yang berfungsi sebagai desinfektan untuk mensterilkan permukaan dari daun *Mirabilis jalapa* L. secara kimia. Cairan perendam dibuang kembali dan sampel dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Air bilasan ketiga ditanam pada media agar dan diinkubasi selama 24 jam (1 hari) bertujuan sebagai media kontrol negatif (-) (Antriana, 2017).

Tahap selanjutnya sampel digerus menggunakan mortir lalu ditumbuhkan dalam media NA lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (1 hari). Hasil biakan yang tumbuh kemudian dilakukan pengujian media SMA (*Skim milk* agar) untuk melihat kemampuan zona bening di sekitar koloni sehingga diketahui indeks proteolitik. Selanjutnya dilakukan metode goresuntuk mendapatkan biakan murni. Tahap fermentasi koloni murni dilakukan pada media NA miring berguna untuk pengujian identifikasi dan media cair BHI berguna untuk pengujian ekstraksi. Karakterisasi bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan Gram menggunakan alat mikroskopis (Lumyong, 2001).

5. Pembuatan Media

5.1. Pembuatan Media NA (*Nutrient agar*). Media NA dibuat dengan cara menimbang sebanyak 5,04 gram serbuk NA dilarutkan dalam 180 mL *aquadest*. Kemudian dicampur hingga homogen dengan cara pemanasan di atas kompor dan dilakukan pengadukan menggunakan batang kayu. Campuran media di tuang ke dalam tabung reaksi untuk dilakukan sterilisasi autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121⁰C dengan

tekanan sebesar 1 atm. 6 media yang akan digunakan kemudian dituang ke dalam cawan petri, sedangkan 6 media yang dituang ke dalam tabung reaksi diletakkan dalam posisi miring danbiarkan hingga media memadat.

5.2. Pembuatan Media BHI (*Brain-heart infusion*). Media BHI dibuat dengan cara menimbang sebanyak 22,2 gram serbuk BHI dilarutkan dalam 600 mL *aquadest*. Media tersebut dicampur hingga homogen dengan cara pemanasan diatas kompor sampai mendidih. Setelah mendidih diamkan selama 10 menit kemudian dituang kedalam erlemeyer 600 mL, tutup menggunakan kapas kemudian dilakukan sterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121⁰ C dengan tekanan sebesar 1 atm. Media yang akandigunakan dituang ke dalam botol steril ukuran 150 mL.

6. Peremajaan Isolat murni Bakteri Endofit

Kultur murni diremajakan dalam kondisi aseptis di dalam laminar air flow (LAF) menggunakan media NA dalam cawan petri dengan metode streakdan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (1 hari).

Isolat bakteri yang akan diuji, dicek kemurnian koloni dengan melakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis bakteri meliputi pertumbuhan dan morfologi bakterinya berupa bentuk, warna, dan bagian tepi koloni. Sementara itu, pengamatan mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan Gram (Alexander, *et al.*, 2004).

7. Fermentasi Isolat Bakteri Endofit

Fermentasi bakteri bertujuan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder yang diduga berpotensi sebagai antioksidan. Fermentasi dilakukan dengan cara menumbuhkan koloni murni endofit pada media NA miring dan BHI cair.

Fermentasi pada media NA miring dilakukan dengan cara memindahkan 1 koloni murni ke media NA miring. Caranya yaitu dengan mengambil 1 ose koloni lalu goreskan pada media NA miring dari bawah sampai atas lalu tutup dengan kapas steril, kemudian diinkubasi selama 24 jam(1 hari) pada suhu 37⁰ C didalam inkubator.

Fermentasi pada media BHI cair, mengambil 1 ose koloni murni lalu dimasukkan ke dalam botol steril ukuran 150 mL yang sudah diinokulasikan pada media BHI cair sebanyak 100 mL lalu di vortek selama 15 menit.

Kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C dilakukan selama 24 jam atau selama 3hari (Desi & Destik, 2021).

8. Identifikasi Bakteri Endofit

8.1. Uji Morfologi. Uji morfologi isolat bakteri endofit digoreskan padamedia NA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam (1 hari) di dalam inkubator. Hasil pengamatan isolat bakteri dengan mengamati bentuk dan tepi koloni yang dilihat dari atas dan permukaan koloni yang dilihat dari samping (Cappucino dan Sherman, 2014).

8.2. Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram adalah uji identifikasi secara mikroskopis dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri merupakan Gram-positif atau Gram-negatif. Gram-positif maka akan memberikan warna ungu, sedangkan Gram-negatif maka akan memberikan warna merah (Sagita *et al.*, 2017).

Pewarnaan gram dilakukan dengan cara menyiapkan *object glass* kemudian disterilkan dengan alkohol 70%, lalu dipanaskan di atas api bunsen. Biakan bakteri diambil satu ose kemudian diletakkan di atas *object glass* dan fiksasi diatas api bunsen sampai memadat kering (hati-hati, jangan sampai terlalu kering / gosong). *Object glass* ditambahkan 1 tetes larutan gentian violet didiamkan selama \pm 1 menit lalu dibilas menggunakan *aquadest*, kemudian ditambahkan 1 tetes lugol iodin diamkan selama \pm 1 menit lalu dibilas menggunakan akuades, kemudian ditambahkan 1 tetes alkohol sampai tidak adawarna violet lagi lalu dibilas menggunakan akuades, langkah terakhir ditetesi dengan cat safranin didiamkan selama \pm 1 menit kemudian bilas. *Object glass* dibiarkan mengering lalu mengamati hasil pewarnaan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali. Jika pewarnaan Gram menunjukkan hasil positif (+) maka dilakukan uji katalase dan koagulase akan tetapi jika hasil negatif (-) maka akan dilakukan uji biokimia (SIM, SCA, KIA, LIA) (Melani, 2020).

8.3. Uji Biokimia

8.3.1. Katalase. Uji katalase bertujuan untuk mengidentifikasi enzim katalase yang berada di dalam bakteri. Uji katalase sangat penting untuk bisa membedakan spesies bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase positif. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% pada *object glass*. Biakan dioleskan pada *object glass* yang sudah ditetesi hidrogen peroksida menggunakan jarum ose. Terbentuknya gelembung-gelembung udara menunjukkan hasil yang

positif (Dewi, 2013).

8.3.2. Uji Koagulase. Tujuan dari uji koagulase adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri memproduksi enzim koagulase yang dapat menggumpalkan fibrin. Reaksi positif koagulase sangat penting untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies *Staphylococcus* yang lain. Uji koagulase dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan bakteri dari media NAMiring masukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 1 mL plasma citratarah kelinci. Kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam (1 hari) didalam inkubator. Terbentuknya gumpalan pada medium dan cairan sedikit mengental menunjukkan hasil uji positif (Toelle, 2014).

9. Ekstraksi Isolat Endofit

Dari hasil fermentasi, biakan endofit yang diinokulasikan pada 100 mL media BHI cair, yang telah diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37° C selama 72 jam (3 hari). Setiap hari dilakukan penggojokan pagi dan sore hari selama 15 menit. Hari ke-1, ke-2, dan ke-3. Kultur hasil fermentasi kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 5000rpm selama 30 menit. Setelah itu, supernatan dipisahkan dari pelet sel untuk diambil supernatannya. Supernatan yang diperoleh dilakukan uji pemurnian protein (Sagita *et al.*, 2017).

10. Uji Pemurnian

Uji pemurnian amonium sulfat digunakan untuk memanfaatkan kadar garam tinggi untuk pengendapan protein (Cutler, 2024). Amonium sulfat digunakan untuk proses pemurnian karena sifatnya sangat larut, murah, memiliki kemampuan kemurnian yang sangat tinggi dan tidak mengubah pH larutan protein (Rosalina, 2017).

Hasil supernatan yang sudah dipisahkan dengan pelet kemudian dilakukan proses penjuhan dengan penambahan serbuk garam amonium sulfat sampai tingkat konsentrasi 80% yang berguna untuk memurnikan larutan protein. Homogenkan diatas *hot plate*, atur kecepatan pada 2000 rpm selama 15menit, usahakan jangan sampai berbusa. Hasil pemurnian kemudian dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Setelah itu, dilakukan pemisahan supernatan dan pelet. Pelet yang diperoleh dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (Rohishoh, 2012).

11. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pelet murni hasil ekstraksi yang diperoleh akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode perendaman radikal

bebas menggunakan larutan DPPH.

11.1. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM. Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan menimbang sebanyak 7,9 mg (BM 395,2) DPPH dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL, tambahkan pelarut metanol *p.a* secara bertahap sampai tanda batas, kemudian kocok pelan sampai homogen, Larutan ini akan digunakan sebagai larutan blanko untuk pengujian aktivitas antioksidan. Larutan DPPH dibuat dalam ruangan yang terhindar dari cahaya (Harmastini, 2016).

11.2. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Larutan DPPH.DPPH yang sudah dibuat selanjutnya dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Volume dicukupkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas lalu dikocok hingga homogen. Serapan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm.

11.3. Pembuatan Larutan Induk Vitamin C. Vitamin C sebagai kontrol + ditimbang sebanyak 10 mg. dilarutkan dengan metanol *p.a* lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, volume dicukupkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas, lalu kocok pelan hingga homogen.

11.4. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Sampel. Larutan sampel dari ekstrak yang diperoleh ditimbang sebanyak 10 mg dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml,tambahkan pelarut metanol *p.a* ad tanda batas, lalu kocok pelan hingga homogen.

11.5. Mengukur *Operating Time* Larutan Pembanding dan Ekstrak Uji. Memipet masing-masing larutan induk sebanyak 1 mL masukkan ke dalam labu ukur 5 mL, tambahkan 1 mL larutan DPPH, cukupkan dengan larutan metanol *p.a* sampai tanda batas. Kemudian ukur absorbansinya pada menit ke 1 sampai menit ke 30 menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Harmastini, 2016).

11.6. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Induk Vitamin C 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm. Larutan induk vitamin C masing- masing dipipet sesuai konsentrasi dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, tambahkan metanol sampai tanda batas dan gojok. Langkah berikutnya yaitu memipet 1 ml ekstrak larutan dari setiap konsentrasi, dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, tambah dengan 1 mL larutan DPPH, cukupkan dengan larutan metanol *p.a* sampai tanda batas lalu kocok. Melakukan pengukuran serapan dengan spektrometer UV-Vis pada panjang gelombang 516. (Chyau, *et al.*, 2002).

11.7. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm. Memipet larutan induk sesuai dengan seri

konsentrasi lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, tambahkan metanol sampai tanda batas dan gojok. Langkah berikutnya yaitu memipet 1 ml ekstrak larutan dari setiap konsentrasi, dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, tambah dengan 1 mL larutan DPPH, cukupkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas lalu kocok. Serapan diukur pada panjang gelombang 516 nm (Harmastini, 2016).

11.8. Penentuan Persen Inhibisi. Aktivitas penangkal radikal diekspresikan sebagai persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

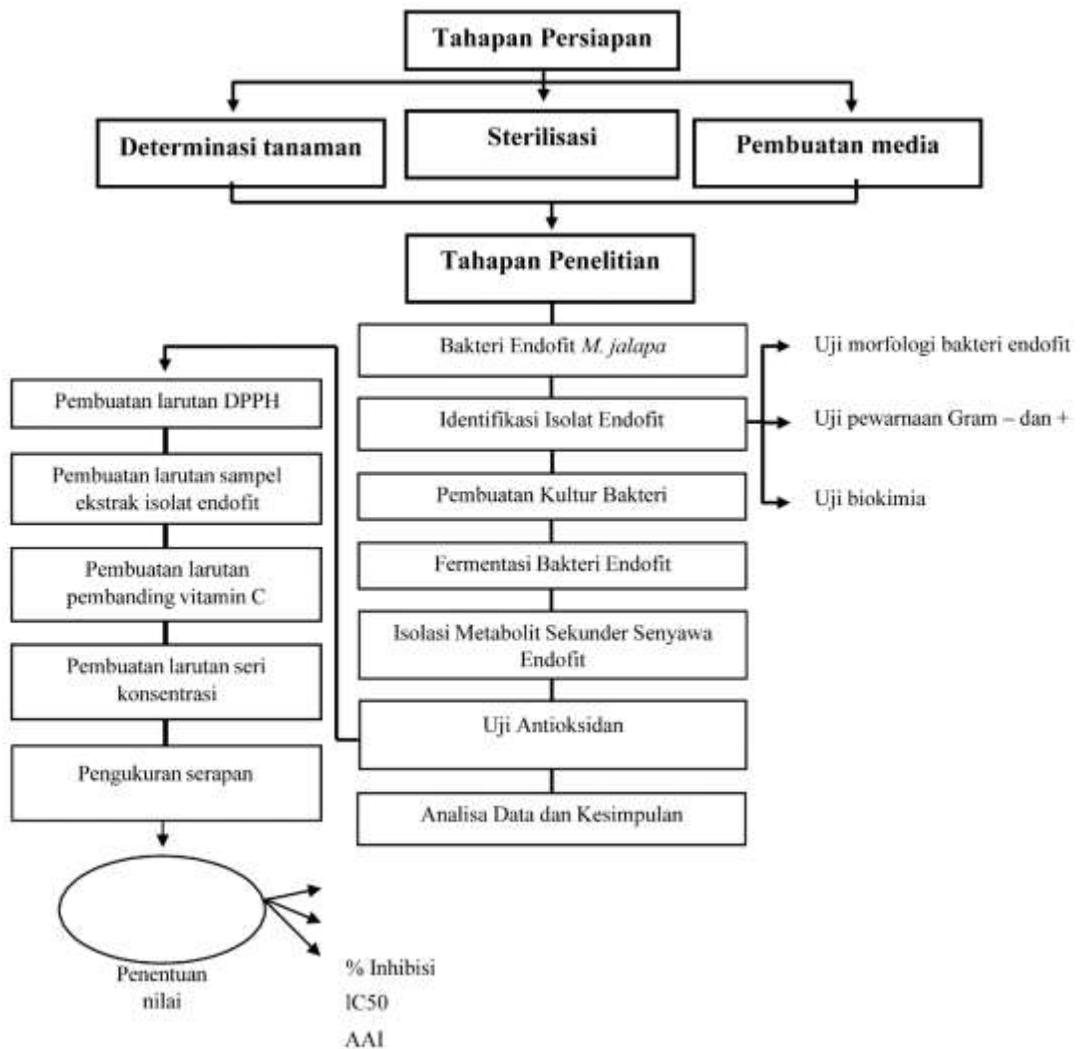
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorban kontrol} - \text{absorban uji}}{\text{absorban kontrol}} \times 100\%$$

(Ghosal, *et al.*, 2012).

F. Analisis Data

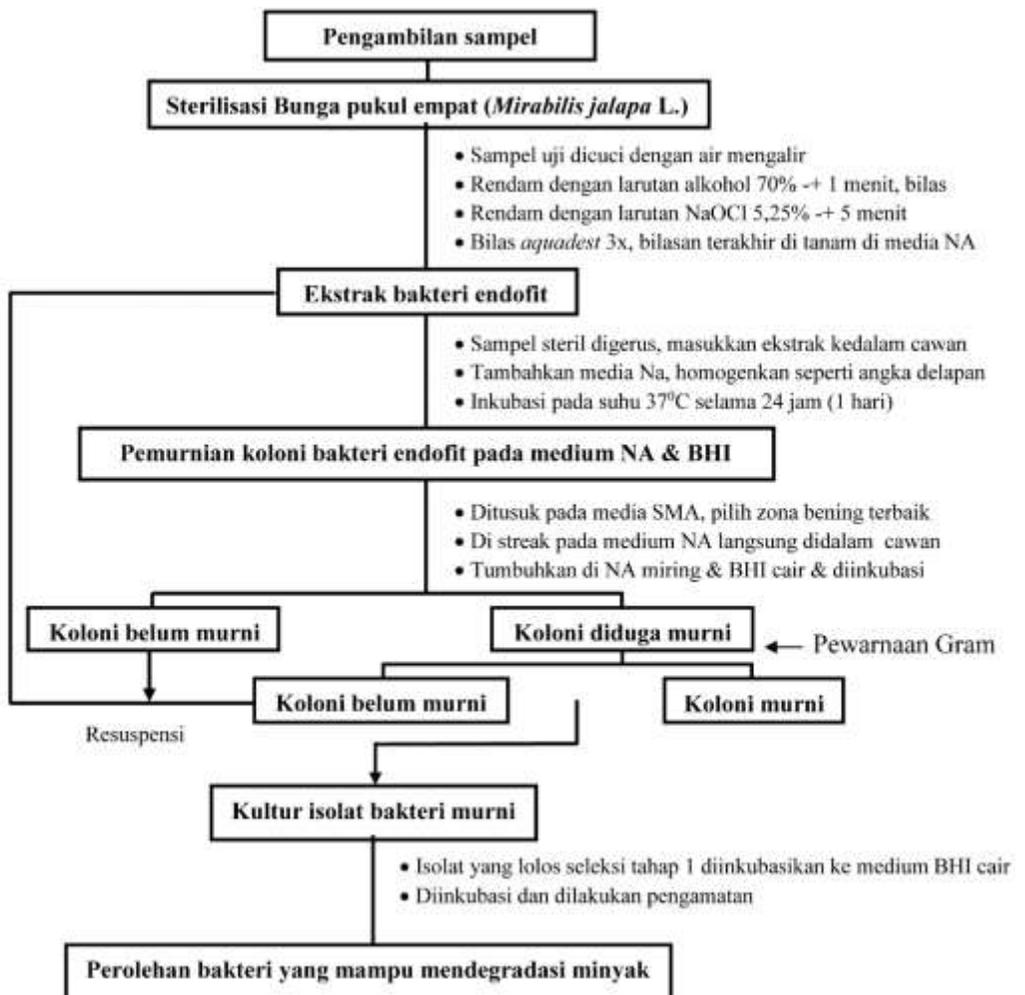
Hasil penelitian uji aktivitas antioksidan dari isolasi bakteri endofit pada tanaman bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) dianalisis berdasarkan nilai aktivitas zona bening yang diperoleh. Data yang diperoleh digunakan untuk ujikemurnian isolat endofit, uji identifikasi, uji biokimia dan pemurnian supernatan dari hasil fermentasi. Hasil semua data yang diperoleh akan dilakukan analisa pengujian DPPH untuk menentukan nilai IC 50.

G. Skema Jalannya Penelitian



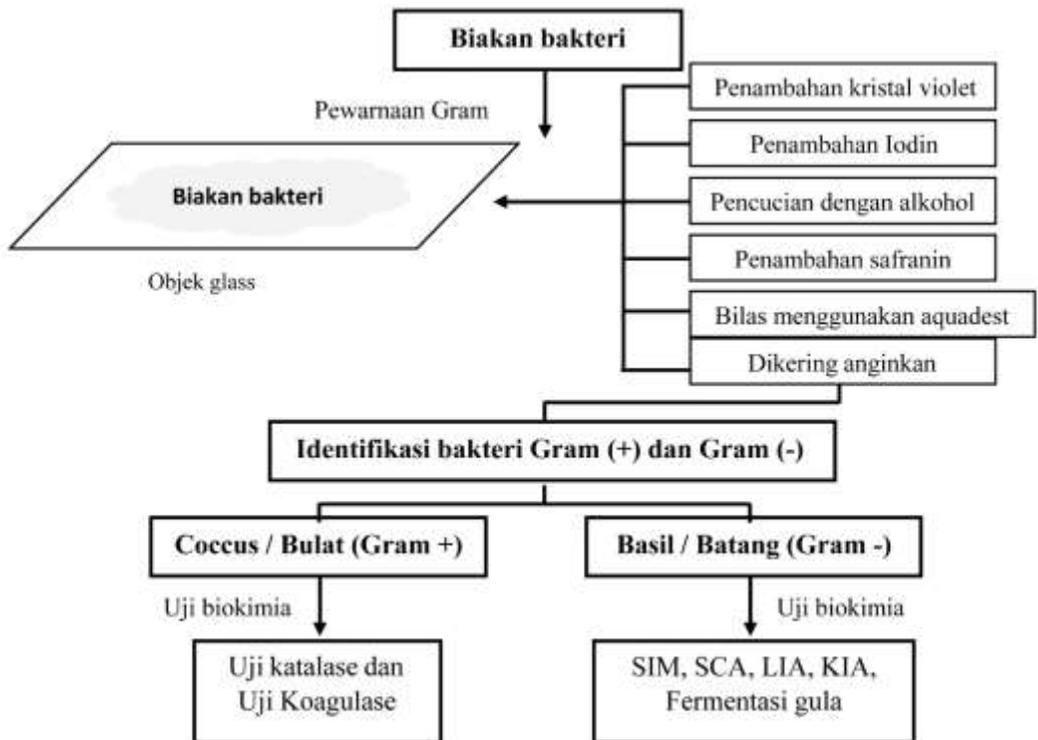
Gambar 3. Skema kerja (I). Jalannya penelitian

H. Isolasi Bakteri Endofit



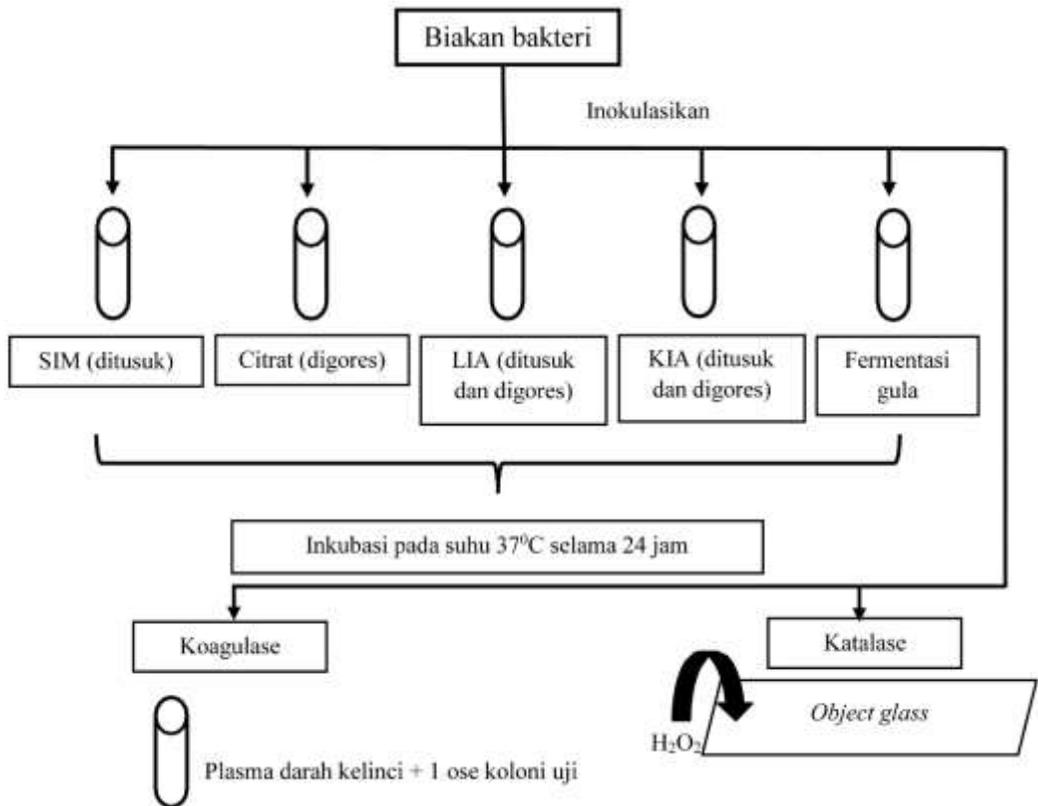
Gambar 4. Skema Kerja (II). Isolasi Bakteri Endofit

I. Pewarnaan Gram



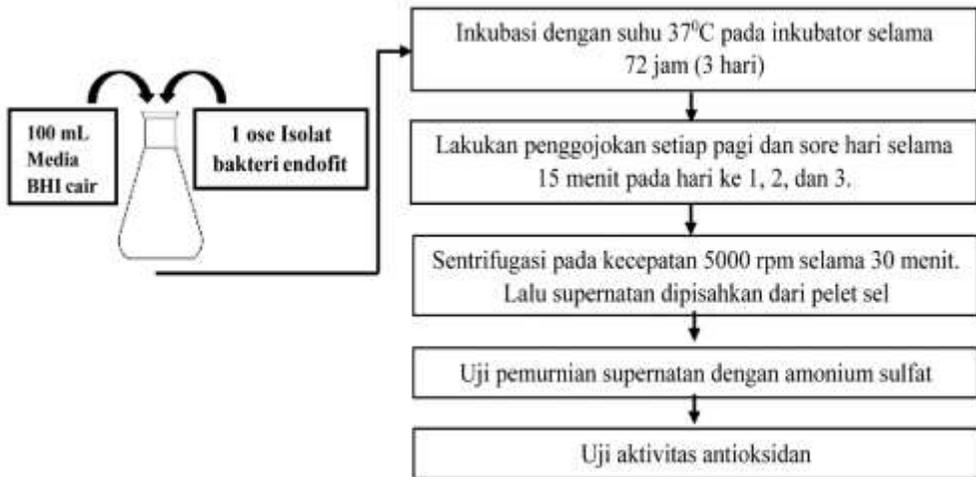
Gambar 5. Skema kerja (III). Pewarnaan Gram

J. Uji Biokimia



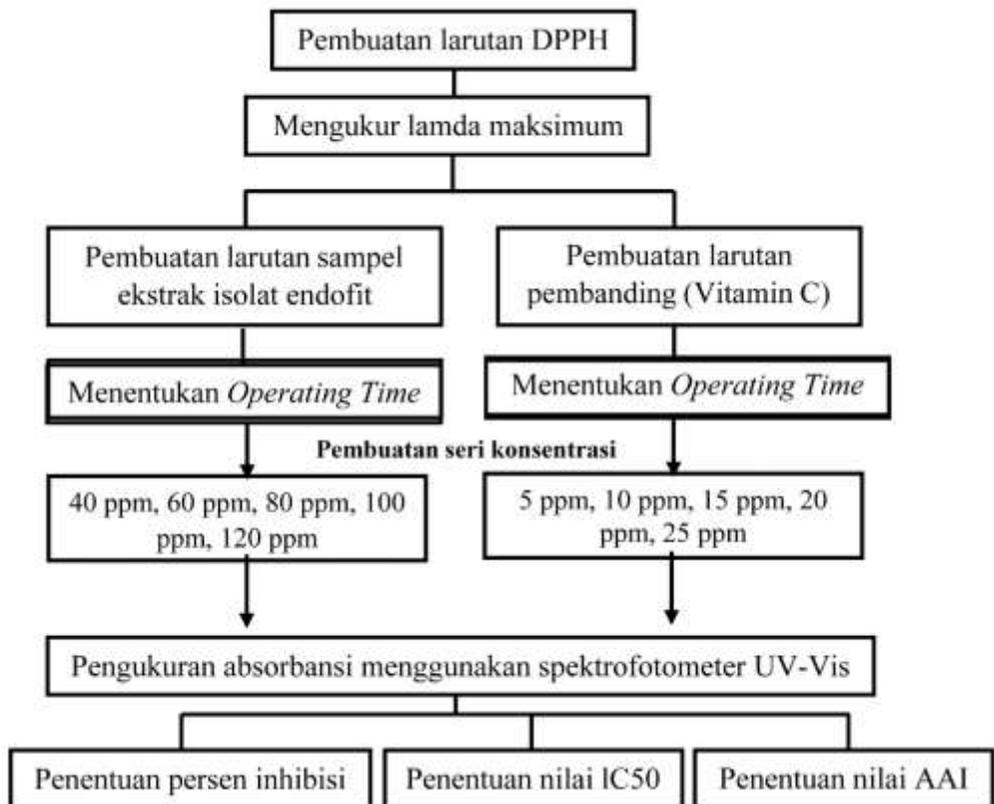
Gambar 6. Skema kerja (IV). Uji Biokimia Isolat Endofit

K. Fermentasi Isolat Bakteri Endofit



Gambar 7. Skema kerja (V). Fermentasi Isolat Bakteri Endofit

L. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH



Gambar 8. Skema kerja (VI). Uji Aktivitas Antioksidan