

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan objek yang ditentukan peneliti yang memiliki ciri khas tertentu yang akan diteliti. Populasi yang digunakan adalah bakteri endofit dari bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa sinensis* L.) yang diambil dari mahkota berwarna merah, dalam kondisi segar, dan tidak rusak.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang dipilih oleh peneliti sebagai sumber data untuk penelitian dan mewakili karakteristik populasi. Sampel diambil dari isolat – isolat bakteri endofit hasil isolasi dari bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa sinensis* L.).

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah isolat bakteri endofit bunga kembang sepatu yang tumbuh di media *Nutrient Agar* (NA).

Variabel kedua adalah variasi waktu fermentasi isolat bakteri endofit bunga kembang sepatu.

Variabel ketiga penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari isolat bakteri endofit terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dengan metode difusi cakram.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dapat diklasifikasi menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang dirancang untuk mempengaruhi variabel tergantung dan variabel terkendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah isolat - isolat bakteri endofit dari bunga kembang sepatu.

Variabel tergantung adalah variabel yang diukur atau diteliti akibat pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari isolat bakteri endofit.

Variabel terkendali adalah variabel yang dirancang peneliti untuk mempengaruhi variabel bebas dan tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian

ini adalah bunga kembang sepatu, bakteri *S. aureus*, suhu dan kondisi penelitian, sterilisasi, kondisi laboratorium, metode penelitian, dan waktu inkubasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, bunga kembang sepatu adalah bunga mahkota berwarna merah dalam kondisi segar, tidak rusak, tidak layu, dan tidak terkena penyakit.

Kedua, bakteri endofit adalah bakteri yang berasal dari bunga kembang sepatu yang tumbuh di media NA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Ketiga, variasi waktu fermentasi bakteri endofit selama 24 jam, 48 jam, 72 jam dalam media BHI dengan suhu 37°C

Keempat, bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret.

Kelima, aktivitas antibakteri adalah kemampuan senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh isolat bakteri endofit yang menghambat pertumbuhan bakteri uji dengan metode difusi cakram.

Keenam, diameter daya hambat adalah diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri dengan melihat terbentuknya zona bening di sekitar cakram.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *beaker glass*, oven, autoklaf, jarum ose, kapas lidi, pinset, erlenmeyer, sentrifuge, batang pengaduk, penggaris, jangka sorong, spidol, spatel, *object glass*, mikroskop, vial, LAF, cawan petri, erlenmeyer, inkubator, pipet tetes, silet, lampu bunsen, mikropipet dan tip, *vortex mixer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, aluminium foil, lemari pendingin, dan timbangan analitik.

### **2. Bahan**

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bunga kembang sepatu, bakteri *S. aureus* ATCC 25923, media *Nutrient Agar* (NA), media *Brain Heart Infusion* (BHI), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media SIM, media LIA, media KIA, media sitrat, *Vogel Johnson Agar* (VJA), pewarna kristal violet, pewarna safranin, iodin,

alkohol 70%, reagen erlich A dan B, aquades, natrium hipoklorit 5,25 %, cakram *disk* ciprofloxacin, dan kertas cakram.

Bunga kembang sepatu adalah bunga mahkota berwarna merah dalam kondisi segar, tidak rusak, tidak layu, dan tidak terkena penyakit.

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S. aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret.

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah media NA, media BHI, media MHA, media VJA, media SIM, media LIA, media KIA, media sitrat, dan media fermentasi gula - gula.

Bahan kimia yang digunakan untuk sterilisasi adalah alkohol 70%, aquades, dan natrium hipoklorit 5,25 %.

Kontrol positif yang digunakan adalah *disk* ciprofloxacin 5 µg.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan kebenaran bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa sinensis* L.) yang digunakan pada penelitian. Determinasi dilakukan dengan mengamati morfologi bunga kembang sepatu. Determinasi dilakukan di Universitas Setia Budi.

##### **2. Sterilisasi alat dan bahan**

Sterilisasi dilakukan untuk memastikan alat dan bahan yang digunakan dalam keadaan tidak terkontaminasi. Media pengujian disterilisasi menggunakan autoklaf yang telah diatur pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Alat pengujian (kapas lidi, alat gelas, dan cawan petri) dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan disumbat, selanjutnya disterilisasi menggunakan oven suhu 171°C selama 30 menit.

##### **3. Pembuatan media**

Pembuatan media NA, MHA, VJA, SIM, LIA, KIA, dan sitrat dengan melarutkan bubuk media dengan pelarut. Pencampuran bubuk media dan pelarut dilakukan di atas kompor, diaduk hingga merata menggunakan batang pengaduk. Sterilkan media menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media dituang ke dalam cawan petri dan tabung reaksi dengan posisi  $\pm 45^\circ$ , biarkan hingga memadat. Komposisi media pada lampiran 10 – 16.

Pembuatan media BHI dan fermentasi gula – gula dengan melarutkan bubuk media dengan pelarut. Campuran bubuk media dan

pelarut, diaduk hingga merata menggunakan batang pengaduk. Sterilkan media menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Komposisi media pada lampiran 11 dan 18.

#### **4. Isolasi bakteri endofit**

Teknik isolasi dalam pengujian bakteri endofit dilakukan dengan sterilisasi permukaan tanaman dengan tujuan menghilangkan bakteri epifit. Bunga kembang sepatu dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian direndam dengan alkohol 70% selama 45 detik, larutan natrium hipoklorit 5,25 % selama 45 detik, dan alkohol 70% selama 45 detik, selanjutnya dibilas dengan aquades steril 4 - 5 kali. Potong bunga kembang sepatu sepanjang 1 - 3 cm menggunakan silet steril secara aseptis, potongan bunga kemudian ditanam pada media NA diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam hingga terbentuk koloni di sekitar potongan bunga (Juyal *et al.*, 2023; Shekhawat *et al.*, 2023). Koloni yang terbentuk diambil 5 - 6 koloni berdasarkan bentuk koloni, warna, bentuk tepian, dan elevasi. Bakteri endofit dimurnikan pada media NA di cawan petri yang telah dibagi menjadi 4 kuadran, diinokulasi dengan cara digores pada media secara zig - zag, diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C (Purwanto *et al.*, 2014).

#### **5. Peremajaan bakteri**

Peremajaan bakteri dilakukan untuk memperbanyak dan meregenerasi bakteri dengan cara menginokulasikan satu ose biakan murni bakteri endofit dan bakteri uji ke dalam media NA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator.

#### **6. Identifikasi bakteri endofit**

**6.1 Uji morfologi.** Bakteri endofit diinokulasi pada media NA dengan metode *streak plate*, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh diidentifikasi dengan mengamati bentuk koloni, elevasi, bentuk tepian, dan warna koloni yang tumbuh di atas media.

**6.2 Pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif serta mengamati bentuk sel bakteri. Bakteri endofit diambil 1 ose letakkan di bagian tengah kaca objek dan difiksasi di atas bunsen sehingga membentuk noda pada kaca objek. Kaca objek ditetesi dengan pewarna basa yaitu Gram A (kristal violet) 1 tetes lalu didiamkan selama 1 menit, bilas *object glass* dengan air mengalir. Kaca objek ditetesi dengan penajam Gram B (mordant/ iodin) 1 tetes didiamkan selama 1 menit, bilas *object glass* dengan air mengalir. Kaca objek ditetesi dengan peluntur warna Gram C

(etanol – aseton) 1 tetes dibiarkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Kaca objek ditetesi dengan Gram D (safranin) 1 tetes yang merupakan pewarna basa berwarna merah, selanjutnya dibiarkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir, dibiarkan hingga mengering. Hasil diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan ditambahkan minyak imersi, bila warna terlihat ungu menandakan bakteri endofit Gram positif, bila terlihat merah menandakan bakteri endofit Gram negatif (Pratiwi, 2008).

**6.3 Uji biokimia.** Identifikasi uji biokimia dilakukan menggunakan media SIM, KIA, LIA, sitrat, dilanjutkan uji katalase, uji koagulase, dan fermentasi gula – gula.

**6.3.1 Media *Sulfida Indol Motility* (SIM).** Biakan bakteri endofit diambil 1 ose kemudian ditusuk ke media SIM, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji positif sulfida dapat diamati jika media berwarna hitam, hasil uji positif indol dapat diamati jika media terbentuk warna merah setelah ditambahkan reagen Erlich A dan B sebanyak 3-5 tetes, uji motilitas positif jika terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar pada bekas tusukan (Kusumasari *et al.*, 2023).

**6.3.2 Media *Kliger Iron Agar* (KIA).** Biakan bakteri endofit diambil 1 ose diinokulasi dengan ditusuk dan digores pada bagian miring media KIA, diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji jika pada bagian miring terbentuk warna merah dan bagian dasar berwarna kuning (ditulis K/A), jika bagian miring dan dasar berwarna merah (ditulis K/K), terbentuk gas dengan pecahnya media (ditulis G<sup>+</sup>), terbentuk warna hitam pada media (ditulis S<sup>+</sup>) (Kusumasari *et al.*, 2023).

**6.3.3 Media *Lysine Iron Agar* (LIA).** Biakan bakteri endofit diambil 1 ose diinokulasi pada media dengan cara ditusuk dan digores pada bagian miring media LIA, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji bagian dasar berwarna kuning dan bagian miring berwarna ungu (ditulis K/A), jika bagian dasar dan miring berwarna ungu ditulis (K/K), terbentuk warna hitam (ditulis S<sup>+</sup>) (Kusumasari *et al.*, 2023).

**6.3.4 Media sitrat.** Biakan bakteri endofit diambil 1 ose diinokulasi pada media dengan ditusuk dan digores pada bagian miring media sitrat, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif bila media berwarna hijau berubah menjadi biru (Kusumasari *et al.*, 2023).

**6.3.5 Media fermentasi gula – gula.** Jenis gula yang digunakan yaitu laktosa, glukosa, sukrosa, dan maltosa. Biakan bakteri endofit diambil 1 ose diinokulasikan dalam media gula yang didalamnya berisi tabung durham, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Media fermentasi gula ditambahkan *phenol red* sebagai indikator adanya pembentukan asam, hasil positif bila media gula berubah warna dari merah menjadi kuning dan terbentuk gelembung pada tabung durham. Warna kuning menandakan bakteri membentuk asam dari fermentasi gula, jika terdapat gelembung pada tabung durham menandakan fermentasi menghasilkan CO<sub>2</sub> (Anggrayeni *et al.*, 2019).

**6.3.6 Uji katalase.** Teteskan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% diteteskan sebanyak 1 tetes pada *object glass*. 1 ose biakan bakteri diambil dan dihomogenkan, diamati ada tidaknya gelembung udara yang dihasilkan. Positif uji katalase jika terbentuk gelembung udara (Lasmini *et al.*, 2022).

**6.3.7 Uji koagulase.** Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang mengandung EDTA. Plasma darah kelinci diambil 1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan satu ose bakteri, dan diinkubasi selama 6 jam pada suhu 37°C. Setiap jam dilakukan pengamatan untuk melihat apakah terbentuk gumpalan, positif uji koagulase bila terdapat gumpalan dalam tabung, jika belum menunjukkan hasil positif maka inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam (Ramadani *et al.*, 2023).

## 7. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

**7.1 Uji Morfologi.** Pengujian morfologi menggunakan media VJA yang ditambahkan kalium telurit 3% sebanyak 3 tetes untuk mengkonfirmasi jenis bakteri dari genus *S. aureus*. Suspensi bakteri diambil 1 ose dan digoreskan pada media VJA dengan metode goresan kuadran (*streak quadrant*), kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Bakteri *S. aureus* akan membentuk koloni bulat dengan pusat hitam dan memberi warna kuning pada media (Vebriani *et al.*, 2023). Koloni yang berwarna hitam terjadi karena *S. aureus* mereduksi kalium telurit menjadi logam telurium, terbentuk warna kuning di sekitar koloni disebabkan *S. aureus* memfermentasi manitol menjadi asam, indikator merah dalam media berubah menjadi kuning (Tobi *et al.*, 2022).

**7.2 Pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif serta mengamati bentuk sel bakteri. Bakteri endofit diambil 1 ose letakkan di bagian

tengah kaca objek dan difiksasi di atas bunsen sehingga membentuk noda pada kaca objek. Kaca objek ditetesi dengan pewarna basa yaitu Gram A (kristal violet) 1 tetes lalu didiamkan selama 1 menit, bilas *object glass* dengan air mengalir. Kaca objek ditetesi dengan penajam Gram B (mordant/ iodin) 1 tetes didiamkan selama 1 menit, bilas *object glass* dengan air mengalir. Kaca objek ditetesi dengan peluntur warna Gram C (etanol – aseton) 1 tetes dibiarkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Kaca objek ditetesi dengan Gram D (safranin) 1 tetes yang merupakan pewarna basa berwarna merah, selanjutnya dibiarkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir, dibiarkan hingga mengering. Hasil diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan ditambahkan minyak imersi. *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang akan memberikan warna ungu ketika diamati di bawah mikroskop (Hayati *et al.*, 2019; Pratiwi, 2008).

**7.3 Uji Katalase.** Teteskan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3% ditetaskan sebanyak 1 tetes pada *object glass*. 1 ose biakan bakteri diambil dan dihomogenkan, diamati ada tidaknya gelembung udara yang dihasilkan. Bakteri *S. aureus* memberikan positif uji katalase jika terbentuk gelembung udara (Lasmini *et al.*, 2022).

**7.4 Uji Koagulase.** Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang mengandung EDTA. Plasma darah kelinci diambil 1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan satu ose bakteri, dan diinkubasi selama 6 jam pada suhu  $37^\circ C$ . Setiap jam dilakukan pengamatan untuk melihat apakah terbentuk gumpalan, positif uji koagulase bila terdapat gumpalan dalam tabung, jika belum menunjukkan hasil positif maka inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam. Bakteri *S. aureus* memberikan hasil positif uji koagulase, ditandai dengan terlihatnya gumpalan dalam tabung (Ramadani *et al.*, 2023).

## **8. Pembuatan suspensi bakteri *S.aureus***

Biakan bakteri diambil 1-2 ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media BHI dihomogenkan dengan *vortex mixer*, selanjutnya diinkubasi dengan suhu  $37^\circ C$  selama 24 jam di dalam inkubator. Standarisasi suspensi dengan larutan baku Mc Farland konsentrasi 0,5 yang diperkirakan sama dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml (CLSI, 2023).

## **9. Fermentasi isolat bakteri endofit**

Senyawa metabolit sekunder dihasilkan melalui proses fermentasi bakteri endofit menggunakan media cair BHI. Proses

fermentasi dilakukan dengan menginokulasi 1 ose bakteri endofit pada media BHI sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi, kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37°C, dengan penggojogan setiap hari. Kultur bakteri pada 24, 48, dan 72 jam disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm, hasil sentrifugasi berupa supernatan dan biomassa. Supernatan yang dihasilkan digunakan untuk menguji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Supernatan yang telah diambil disimpan dalam vial dan dimasukkan ke dalam kulkas untuk mencegah kerusakan metabolit sekunder.

#### **10. Pengujian aktivitas antibakteri**

Uji aktivitas antibakteri dari bakteri endofit dilakukan dengan metode difusi cakram (*disc diffusion*). Media MHA diambil 20 ml, dimasukkan ke dalam cawan petri, ditunggu hingga memadat. Suspensi bakteri uji *S. aureus* pada media BHI yang telah distandarisasi dengan Mc Farland 0,5 diinokulasikan secara merata menggunakan kapas lidi steril, agar bakteri terdifusi ke dalam media MHA maka perlu didiamkan selama 10 menit. Hasil supernatan fermentasi diambil 50 µL diteteskan ke kertas cakram, dan didiamkan selama 10 menit, kemudian letakkan kertas cakram tersebut pada media MHA yang telah ditanam bakteri uji.

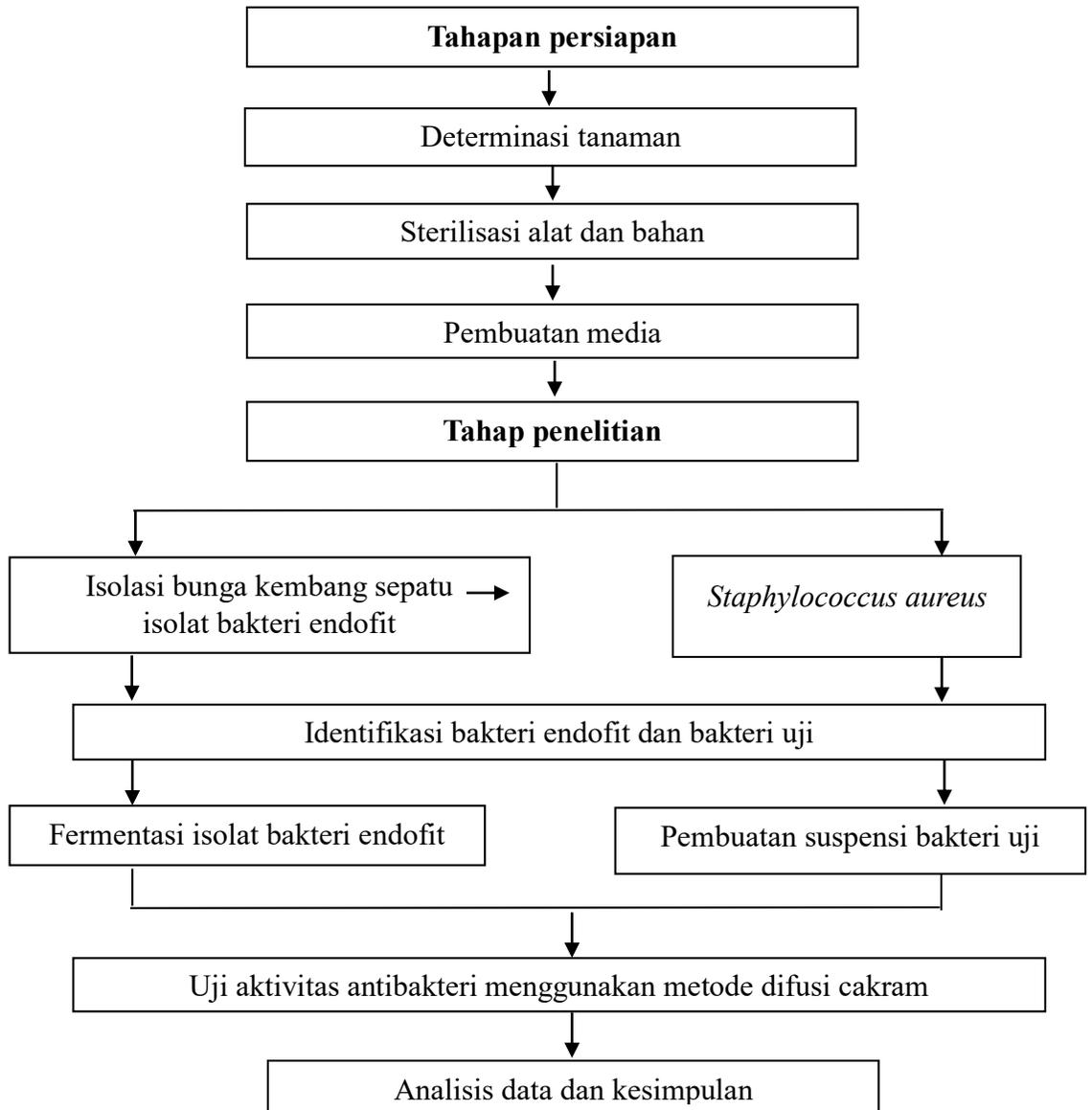
Kontrol positif yang digunakan adalah *disk* ciprofloxacin 5 µg sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah kertas cakram steril. Kontrol positif, kontrol negatif, dan supernatan bakteri endofit diletakkan pada media MHA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Aktivitas antibakteri terlihat setelah inkubasi selama 24 jam dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram dan diukur diameter zona hambatnya menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan milimeter, pengukuran dilakukan dengan 3 kali pengulangan.

#### **E. Analisis Data**

Analisis hasil penelitian dari uji aktivitas antibakteri dari bakteri endofit bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dianalisis berdasarkan zona hambat yang terbentuk. Data yang didapat dianalisis dengan menggunakan *software* SPSS versi 25. Analisis untuk mengetahui normalitas data menggunakan *Saphiro willk*. Analisis untuk mengetahui apakah data homogen atau tidak menggunakan uji *Levene*. Analisis untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dilakukan

dengan uji *One Way Anova* dilakukan untuk mengetahui syarat jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen. Jika terdapat perbedaan signifikan dilanjutkan uji *Post Hoc* menggunakan *Tukey*.

#### F. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema Penelitian

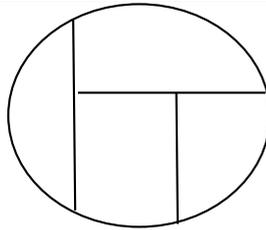
## 1. Isolasi bunga kembang sepatu

Bunga kembang sepatu dicuci dengan air mengalir, kemudian direndam dengan alkohol 70% selama 45 detik, larutan natrium hipoklorit 5,25% selama 45 detik, dan alkohol 70% selama 45 detik, selanjutnya dibilas dengan aquades 4 - 5 kali. Potong sepanjang 1-3 cm menggunakan silet steril secara aseptis.

Potongan sampel bunga kembang sepatu 5 potong ditanam dalam media NA

Diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C, sampai terbentuk koloni

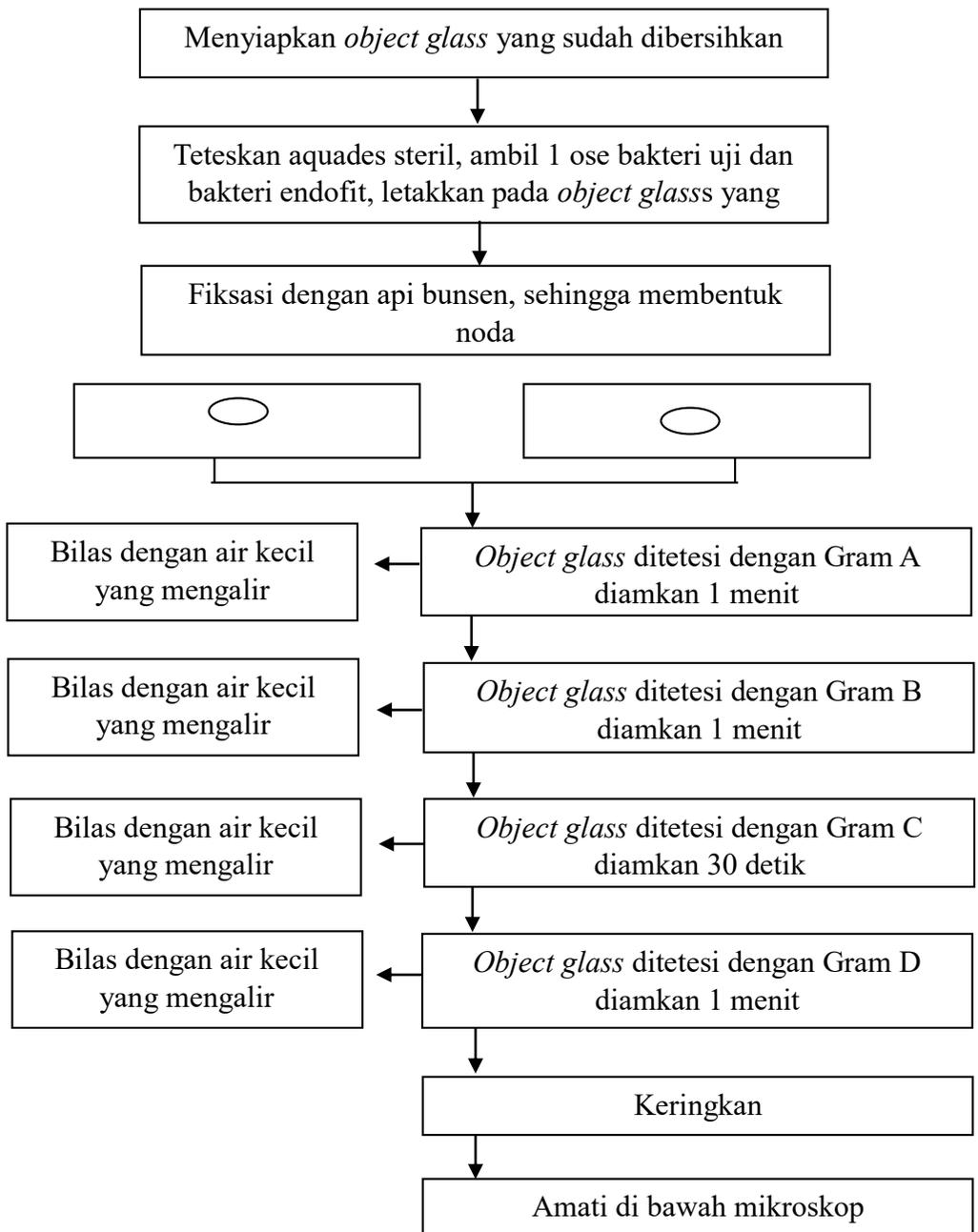
Isolat yang didapat dilakukan pemurniaan



Isolat dilakukan kultivasi

Gambar 5. Skema isolasi bunga kembang sepatu

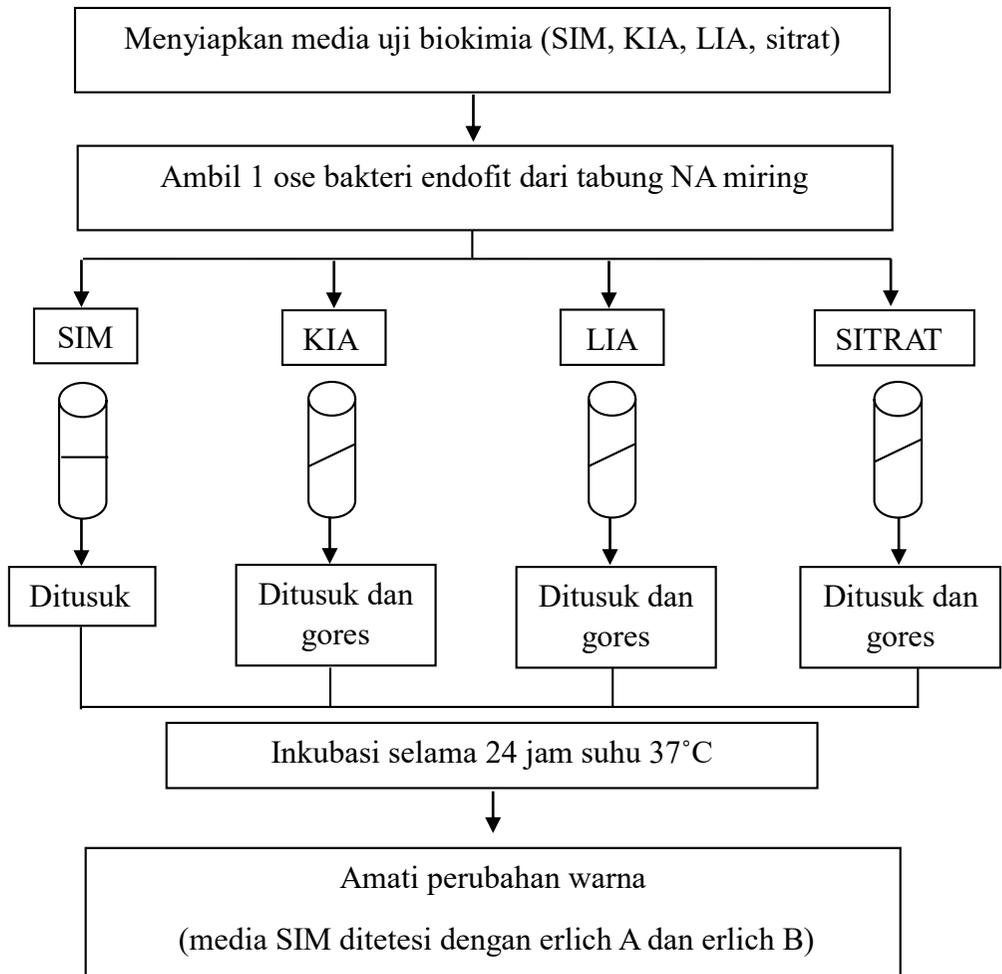
## 2. Uji pewarnaan gram



Gambar 6. Skema Uji pewarnaan gram

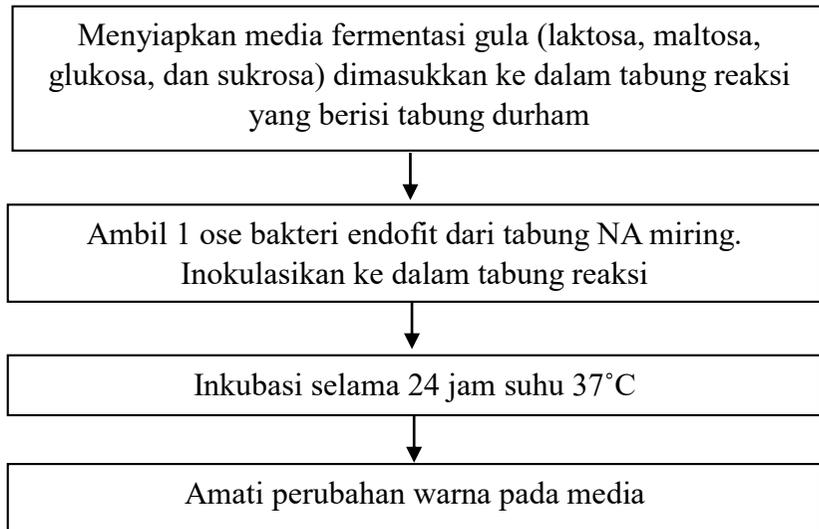
### 3. Uji biokimia (media SIM, KIA, LIA, Sitrat, dan fermentasi gula- gula)

#### ➤ Media SIM, KIA, LIA, sitrat



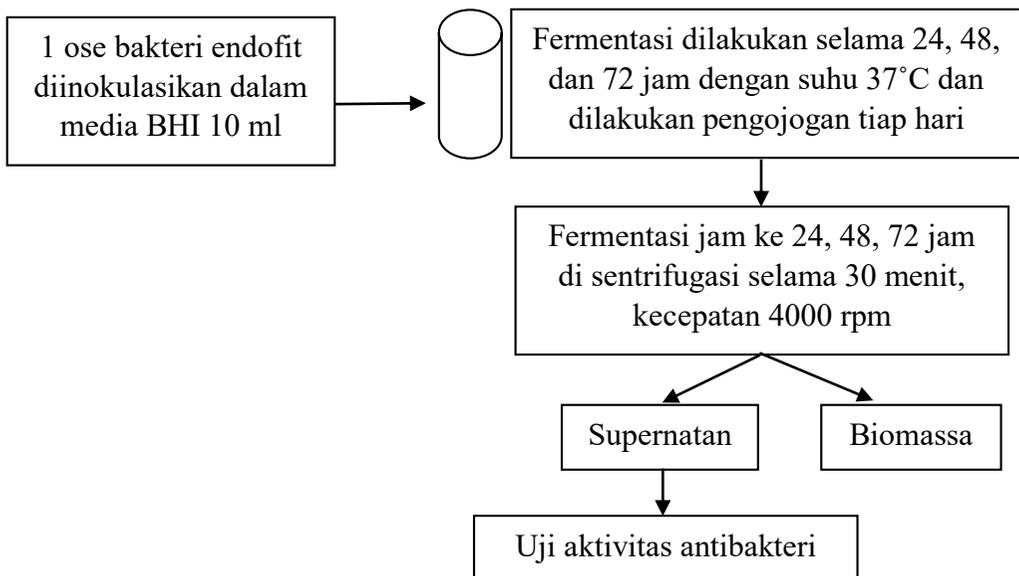
Gambar 7. Uji Biokimia Media SIM, KIA, LIA, sitrat

➤ **Media fermentasi gula**



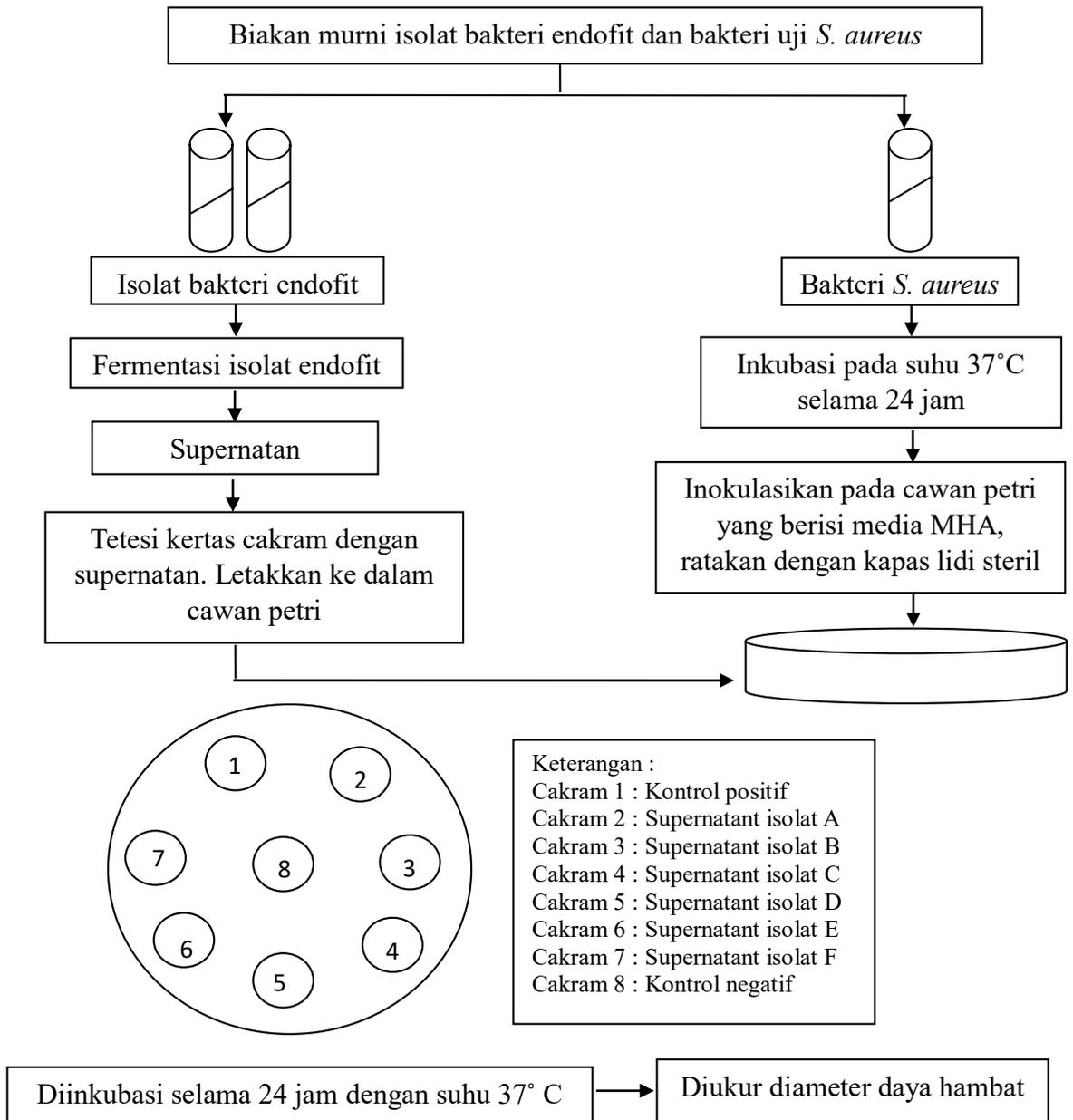
**Gambar 8. Uji Biokimia Media fermentasi gula**

**4. Fermentasi bakteri endofit**



**Gambar 9. Fermentasi bakteri endofit**

### 5. Uji aktivitas antibakteri



Gambar 10. Uji aktivitas antibakteri