

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu percobaan

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Mei sampai Agustus 2024 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari, Kecamatan Tamansari, Kota Tasikmalaya. Pembuatan ekstrak metabolit sekunder dilaksanakan di Universitas Bakti Kencana Husada

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya cawan petri, gelas ukur, timbangan analitik, tabung reaksi, jarum ose, pipet, mikropipet, *tube* mikropipet, erlenmeyer, gelas objek, autoklaf, *magnetic stirrer*, *spreader*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), mikroskop, *plastic wrap*, *aluminium foil*, kertas *stensil*, *hotplate stirrer*, *shaker*, *centrifuge*, api bunsen, inkubator, pinset, label, jangka sorong, *vacuum rotary evaporator*, dan *waterbath*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya isolat mikroba endofit (GJ-3= *Pseudomonas aeruginosa*, GJ-9= *Candida spencermartinsiae*, GJ-12= *Pseudomonas furukawai*, dan FN-1= *Aspergillus flavus*) koleksi laboratorium mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi dari tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Geartn.) yang telah diisolasi dari akar ginseng jawa pada penelitian sebelumnya, isolat patogen *Rhizopus stolonifer* diperoleh dari Indilaboratory Indonesia, di Samarinda, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Nutrient Agar* (NA), Media *Nutrient Broth* (NB), *Potato Dextrose Broth* (PDB), etil asetat, aquadest steril, alkohol 96%, dan DMSO 10%.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan metode eksperimental. Penelitian eksperimen yang dilakukan adalah uji *in vitro* ekstrak metabolit sekunder yang dipilih dari koleksi isolat mikroba endofit hasil eksplorasi penelitian sebelumnya dari akar tanaman ginseng jawa sebagai bahan uji aktivitas antibakteri terhadap patogen *Rhizopus stolonifer*. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu

Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan ekstrak metabolit isolat mikroba endofit dan 5 ulangan.

Perlakuan *screening* mikroba endofit yang diujikan pada patogen *Rhizopus stolonifer*:

A = Tanpa mikroba endofit (kontrol)

B = Isolat mikroba endofit FN-1 (*Aspergillus flavus*)

C = Isolat mikroba endofit GJ-3 (*Pseudomonas aeruginosa*)

D = Isolat mikroba endofit GJ-9 (*Candida spencermartinsiae*)

E = Isolat mikroba endofit GJ-12 (*Pseudomonas furukawai*)

Model linear dari rancangan acak lengkap (RAL) tersebut adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

keterangan :

Y_{ij} = Nilai pengamatan perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = nilai tengah Umum (rata-rata respon)

T_i = pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

data dimasukkan kedalam sidik ragam sebagai berikut :

Tabel 1. Sidik ragam

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F Tab. 5%
Perlakuan	4	$\sum x^2 - FK$	JK_p/db_p	KT_p/KT_g	2, 87
Galat	20	$JK_t - JK_p$	JK_g/db_g		
Total	24	$\sum T^2/r - FK$			

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada pengaruh

Jika hasil uji F terdapat perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjut jarak berganda duncan pada taraf 5% dengan rumus :

$$LSR (\alpha, dBg, p) = SSR (\alpha, dBg, p).Sx$$

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan :

LSR = *Least Significant Ranges*

SSR = *Studentized Significant Ranges*

Sx = galat baku rata-rata

KT Galat = Kuadrat Tengah Galat

r = jumlah ulangan

3.4 Prosedur penelitian

1. Sterilisasi alat laboratorium

Sterilisasi alat-alat laboratorium dilakukan sebelum pelaksanaan penelitian. Sterilisasi berguna untuk membunuh dan membersihkan semua bentuk mikroba hidup di peralatan dan bahan tanam yang digunakan. Metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode panas lembab dengan menggunakan autoklaf. Sterilisasi alat laboratorium dilakukan setelah alat-alat yang digunakan untuk penelitian tersebut dicuci dengan menggunakan air bersih, lalu selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 sampai 20 menit. Sebelum dimasukkan kedalam autoklaf alat yang terbuat dari kaca dibungkus menggunakan kertas dan plastik.

2. Pembuatan media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Nutrient Agar* (NA) dan *potato dextrose agar* (PDA) sebagai media padat dalam perbanyakan mikroba, sedangkan *Nutrient Broth* (NB) dan *potato dextrose broth* (PDB) merupakan media cair yang digunakan dalam perbanyakn mikroba.

Media NA sebanyak 39 g dilarutkan kedalam 1000 mL aquades dalam *beaker glass*. Selanjutnya dipanaskan menggunakan *hotplate stirer* sampai mendidih. Selanjutnya medium dipindahkan kedalam *erlenmeyer* untuk

kemudian disterilkan di dalam autoklat pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Media *potato dextrose agar* (PDA) sebanyak 39 g dan kloramfenikol 0,05 g dilarutkan bersama aquades 1000 mL dalam *beaker glass*. Selanjutnya media dipanaskan dengan *hotplate stirer* sampai mendidih. Kemudian media disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Media *Nutrient Broth* (NB) sebanyak 8 g dicampurkan dengan 1000 mL aquades dalam gelas kimia 1000 mL, lalu larutan dididihkan dan diaduk hingga rata. Media yang telah selesai dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* 1000 mL ditutup rapat dengan kapas dan kain kasa untuk mencegah masuknya udara.

3. Subkultur isolat mikroba endofit

Subkultur isolat mikroba endofit dilakukan dengan menanam kembali mikroba endofit menggunakan media baru berupa *Nutrient Agar* (NA) untuk pertumbuhan bakteri dan *potato dextrose agar* (PDA) untuk pertumbuhan jamur. Isolat mikroba endofit didapat dari koleksi hasil penelitian sebelumnya yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Keberhasilan subkultur ditandai dengan koloni yang tumbuh pada media agar (Wahyuningsih dan Zulaika, 2018).

4. Ekstraksi metabolit sekunder dari isolat mikroba endofit

Ekstraksi dilakukan untuk melihat potensi mikroba endofit dari akar ginseng jawa dalam menghasilkan metabolit sekunder dengan menggunakan pelarut etil-asetat. Prosedur ekstraksi mikroba endofit mengacu pada penelitian Maulidia *et al.*, (2020); Sharma, Pramanik, dan Agrawal (2016); Shekhawat dan Shah (2013); Kuntari, Sumpono, dan Nurhamidah (2017); Bhardwaj *et. al.*, (2015) adalah sebagai berikut:

- 1) Penyiapan alat dan bahan
- 2) Subkultur mikroba endofit dengan menggunakan media *Nutrient Agar* (bakteri) dan *Potato Dextrose Agar* (jamur).
- 3) Pembuatan media cair *Nutrient Broth* (bakteri) dan *Potato Dextrose Broth* (jamur).

- 4) Mikroba endofit yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* (bakteri) dan *Potato Dextrose Agar* (jamur) diinokulasikan ke dalam labu erlenmeyer ukuran 500 ml yang berisi 500 ml *Nutrient Broth* (bakteri) dan *potato dextrose broth* (jamur)
- 5) Bakteri endofit diinkubasi selama 3 hari dengan kecepatan *shaker* 120 rpm, sementara jamur endofit diinkubasi 14 hari menggunakan *shaker rotator* secara berkala dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C agar didapatkan suspensi mikroba endofit.
- 6) Suspensi tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit
- 7) Ekstraksi dilakukan setelah sentrifugasi melalui prosedur ekstraksi pelarut dengan menggunakan etil-asetat yang ditambahkan ke dalam suspensi mikroba endofit dengan volume yang sama (1:1)
- 8) Suspensi mikroba endofit kemudian diaduk secara merata dengan *shaker rotator* selama 10 menit
- 9) Labu erlenmayer berisi suspensi mikroba endofit didiamkan selama 5 menit hingga terbentuk dua lapisan bening yang tidak dapat tercampur
- 10) Lapisan atas (etil asetat) yang mengandung senyawa hasil ekstraksi dipisahkan dengan menggunakan corong pisah
- 11) Ekstrak filtrat hasil pemisahan diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 35-40°C untuk menghilangkan pelarutnya
- 12) Ekstrak yang telah diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* diuapkan kembali dengan menggunakan *waterbath* hingga dihasilkan ekstrak kasar/kental
- 13) Ekstrak kasar yang dihasilkan kemudian dilarutkan dalam Dimetil sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 1%
- 14) Ekstrak yang sudah siap digunakan disimpan pada suhu 4°C.

5. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

Identifikasi kandungan ekstrak metabolit sekunder mikroba endofit akar ginseng jawa secara kualitatif dilakukan dengan menambahkan pereaksi berupa Dragendorff untuk uji kandungan senyawa alkaloid dan asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 untuk uji kandungan senyawa steroid dan triterpenoid (Habibi, Firmansyah, dan Setyawati, 2018). Sementara itu untuk uji kandungan senyawa tanin menggunakan $FeCl_3$, serta uji kandungan senyawa flavonoid menggunakan serbuk Mg dan HCl (Mailuhu, Runtuwene, dan Koleangan, 2017). Pengujian dilakukan dengan metode plat tetes.

Sampel mengandung senyawa steroid apabila reaksi warna yang dihasilkan yaitu merah kecoklatan, dan sampel mengandung senyawa triterpenoid apabila reaksi warna yang dihasilkan yaitu cokelat-ungu (Habibi, Firmansyah, dan Setyawati, 2018). Sampel mengandung senyawa alkaloid apabila reaksi yang dihasilkan yaitu adanya endapan berwarna merah jingga (Kancherla *et al.*, 2019). Sampel mengandung senyawa flavonoid apabila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan larutan akan mengalami perubahan warna dari warna awal hijau muda menjadi warna jingga (Mailuhu, Runtuwene, dan Koleangan 2017). Sampel mengandung senyawa tanin apabila terjadi perubahan warna dari warna awal hijau muda menjadi hijau kehitaman Harborne (1987) dalam Mailuhu, Runtuwene, dan Koleangan (2017) atau biru tua (Widowati dan Harfia 2009).

6. Uji aktivitas antimikroba

Hasil dari ekstraksi metabolit sekunder isolat mikroba endofit diuji antagonis secara *in vitro* dengan tujuan melihat ekstrak metabolit sekunder mikroba endofit yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan patogen *Rhizopus stolonifer*. Patogen *Rhizopus stolonifer* didapat dari Indilaboratory Indonesia di Kota Samarinda. Pengerjaan uji aktivitas antibakteri ini dilakukan di dalam *laminar air flow* agar tetap dalam keadaan steril. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menuangkan

sebanyak 1 ml suspensi patogen *Rhizopus stolonifer* ke dalam cawan petri yang berisi 9 ml media *potato dextrose agar* (PDA) (Krisyanella, Ardianti, dan Dachriyanus, 2009).

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antimikroba ini yaitu metode difusi menggunakan cakram. Kertas cakram dijenuhkan ke dalam media uji, kertas cakram tersebut berperan sebagai media untuk menyerap bahan antimikroba. Suspensi jamur *Rhizopus stolonifer* diinokulasikan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) kemudian diratakan dengan menggoyangkan cawan petri. Kertas cakram dengan ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak metabolit sekunder mikroba endofit selama 15 menit kemudian diletakkan pada permukaan media dan diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan zona bening dilakukan disekitar kertas cakram dan diameter zona bening diukur dengan menggunakan jangka sorong (Poelongan *et al.*, 2006 dalam Siti, Nadhira, dan Akhmad 2020). Konsentrasi ekstrak metabolit sekunder dalam uji aktivitas antimikroba terhadap patogen *Rhizopus stolonifer* mengacu pada penelitian sebelumnya oleh Amelia (2024), yaitu sebesar 20% karena konsentrasi tersebut sudah efektif menghambat pertumbuhan patogen *Rhizopus stolonifer*.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Parameter pengamatan penunjang

Parameter pengamatan penunjang merupakan pengamatan data yang tidak dianalisis secara statistik. Pengamatan penunjang ini mendukung untuk mengetahui faktor eksternal yang berpotensi mempengaruhi keberlangsungan penelitian. Faktor eksternal ini meliputi suhu, dan kelembaban udara.

3.5.2 Parameter pengamatan utama

Pengamatan utama merupakan pengamatan setiap variabel yang perolehan datanya dianalisis secara statistik untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan pada percobaan tersebut. Parameter pengamatan utama terdiri dari:

1. Hasil ekstraksi

Hasil ekstraksi ini meliputi banyaknya ekstrak metabolit sekunder yang diperoleh dari beberapa mikroba endofit serta mengamati proses ekstraksi dan kaitannya dengan hasil ekstrak yang diperoleh.

2. Jenis metabolit sekunder yang dihasilkan

Data hasil uji kualitatif yaitu adanya reaksi perubahan warna dan endapan tertentu setelah pemberian masing-masing reagen pada masing-masing ekstrak uji. Reaksi tersebut menunjukkan hasil positif (+) terhadap keberadaan senyawa tertentu oleh reagen tertentu.

3. Zona hambat ekstrak terhadap patogen *Rhizopus stolonifer* secara *in vitro*

Pengamatan zona hambat ekstrak metabolit sekunder mikroba endofit terhadap patogen *Rhizopus stolonifer* dilakukan setelah satu hari masa inkubasi (24 jam). Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening di sekitar kertas cakram. Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga hasil perhitungan dari masing-masing perlakuan dirata-ratakan. Cara pengukuran zona hambat berdasarkan rumus (Kipimbob *et al.*, 2019) berikut:

$$\frac{(D_v - D_s) + (D_h - D_s)}{2}$$

keterangan:

D_v = Diameter vertikal cakram

D_h = Diameter horizontal cakram

D_s = Diameter sumur cakram

4. Pengamatan mikroskopis

Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk mengamati adanya perubahan morfologi hifa pada patogen *Rhizopus stolonifer* setelah diuji antagonis dengan ekstrak metabolit sekunder mikroba endofit. Pengamatan tersebut dilakukan pada 1 hari setelah inkubasi dengan menggunakan mikroskop.