

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tipe Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif untuk mengetahui kemampuan zona hambat jamur endofit dari jaringan daun pulai (*Astonia scholaris*) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

B. Waktu dan Tempat Penelitian.

1. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 14 Juni sampai 28 Juli 2023.

2. Lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium MIPA Fakultas Ilmu Tarbiyah Dan Keguruan Institut Agama Islam Negeri Ambon.

C. Alat dan Bahan Penelitian.

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan 3.2.

1. Alat

Tabel 3.1. Alat Yang Digunakan Dalam Penelitian.

No	Alat	Fungsi
1	Laminar flow	Untuk mengalihkan udara bersih secara terus menerus
2	Autoclave	Untuk mensterilisasi bahan
3	Jangka sorong	Untuk mengukur suatu benda kerja
4	Cawan petri	Untuk tempat penyeledikan bakteri
5	Jarum ose	Untuk inokulasi jamur
6	Pembakar Bunsen	Untuk menghasilkan api gas
7	Pengadut kaca	Untuk membantu dekantasi larutan
8	Pinset	Untuk mengambil sampel
9	Aluminium foil	Sebagai penutup bagian mulut alat alat praktikum
10	Mikroskop	Untuk melihat objek objek yang tidak kesat mata
11	Kaca penutup	Untuk menjaga specimen padat ditekan datar
12	Gelas kimia	Sebagai tempat mereaksikan bahan
13	Gelas ukur	Untuk mengukur larutan atau zat cair dengan tepat
14	Tabung reaksi	Tempat mereaksikan dua larutan atau bahan kimia
15	Pipet volimetrik	Mengambil cairan dengan volume tertentu
16	Labu erlemeyer	Untuk menampung larutan
17	Inkubator	Untuk menginkubasi suatu bakteri
18	Timbangan analitik	Untuk menimbang bahan atau zat yang akang digunakan
19	Pisau	Untuk untuk mengikis sampel

2. Bahan

Tabel 3.2. Bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Media PDA	Untuk mengisolasi jamur
2	Media NA	Untuk pertumbuhan bakteri
3	Media NB	Untuk menumbuhkan bakteri
4	Larutan NaCl	Sebagai larutan pengenceran
5	Daun pulai	Sebagai sampel penelitian
6	Air suling	Untuk menghilangkan kontaminan bakteri
7	Tisu	Untuk membantu membersihkan selain menggunakan air
8	Alkohol	Sebagai antiseptik (membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme)
9	Kultur <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>	Sebagai bakteri coba

D. Prosedur Penelitian.

1. Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pulai yang diambil di Stain Arbes. Sampel daun yang digunakan sebanyak 6 helai daun setengah tua Daun tersebut diperoleh dari tumbuhan pulai (*Alstonia scholaris*) yang berada di tepi jalan.

2. Pembuatan media

Media PDA dibuat dengan melarutkan 39 gram PDA dalam 100 mL air suling, mengikuti prosedur yang tertera pada kemasan. Media diaduk hingga merata dengan cara mencampur dan memanaskan dengan *hot plate* dan pengaduk.

untuk mencegah adanya kontaminasi bakteri, media PDA ditambahkan dengan tetrasiklin 0,2 g/l. media selanjutnya distrelisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.¹

3. Isolasi jamur endofit

Isolasi jamur endofit dilakukan dengan metode tanam langsung, yaitu setelah sampel dicuci aquades, direndam alkohol 70% selama 30 detik, larutan NaCl selama 3 menit dan perendaman terakhir menggunakan alkohol 70% selama 1 menit. Selanjutnya, potongan sampel dikeringkan di atas kaca yang steril selama beberapa menit. Setiap sampel dipotong kecil-kecil dan lapisan atas daun dikerok dengan pisau steril kemudian diletakkan pada media PDAC (*Potato Dextrose Agar Cloramphenicol*) dengan permukaan permukaan yang dikerok ditempelkan pada media agar. Sampel diletakkan di atas médium dengan diberi tekanan, dan bagian potongan berada di atas medium. Inokulasi sampel dilakukan di atas cawan petri dan dilakukan triplo, tiap cawan berisi 3 potongan sampel. Selama pekerjaan dilakukan di dalam laminar air flow, dan kemudian inkubasi selama 5 hari pada suhu 25-27°C (suhu ruang). Isolat endofit yang menunjukkan sifat morfologi jamur dipindahkan ke media PDAC yang baru.²

¹ Suci Hatruramadhani, “*Isolasi Dan Identifikasi Jamur Endofit Pada Daun Jamblang (Syzygium Cumini L)*”. (Jurnal Ilmiah Mahasiswa Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan Unsyiah). Vol 2, No 2. Mei 2017. Hal. 81

² Vilca Veronica Hasiani, Islamudin Ahmad, Laode Rijai, “*Isolasi Jamur Endofit Dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan Dari Daun Pacar (Lawsonia Inermis L.)*”. (Jurnal Sains Dan Kesehatan. 2015. Vol 1. No 4). Hal. 147.

4. Pemurnian jamur endofit

Jamur endofit yang tumbuh pada media isolasi PDAC selanjutnya dimurnikan satu per satu secara bertahap. Setiap isolat jamur endofit murni yang diperoleh kemudian disepuh pada cawan petri PDAC. Tujuan dari pemurnian ini adalah untuk mengisolasi koloni endofit yang terisolasi dengan morfologi yang berbeda. Pengamatan morfologi dilakukan kembali setelah 5. hari inkubasi, dan jika diamati pertumbuhan koloni yang berbeda secara makroskopis, maka harus diisolasi kembali hingga diperoleh isolat murni. Jamur endofit diinkubasi pada suhu kamar selama 3-5 hari tergantung pertumbuhannya.³

5. Identifikasi jamur endofit

Identifikasi jamur endofit dilakukan dengan cara mengamati ciri-ciri makroskopis dan ciri-ciri mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan cara melihat warna koloni dan warna sebalik koloni, sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara melihat bentuk hifa dan spora. Menurut Wulandar, identifikasi tersebut dilakukan berdasarkan pengamatan koloni, meliputi warna koloni, bentuk koloni pada cawan petri (konsentris dan nonsentrik), struktur koloni dan pertumbuhan koloni (cm/hari). Pengamatan mikroskopis meliputi ada tidaknya septa pada hifa (sebagian atau tidak berseptum), pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), warna hifa dan konidia (hialin gelap atau transparan). Identifikasi jamur secara mikroskopis dapat dilakukan dengan metode *slide culture*.⁴

³*Ibid.*, 146.

⁴ Suci Hatruramadhani, "Isolasi Dan Identifikasi Jamur Endofit Pada Daun Jamblang (*Syzygium Cumini L*)". (Jurnal Ilmiah Mahasiswa Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan Unsyiah). Vol 2, No 2. Mei 2017. Hal. 82.

6. Uji Antibakteri Jamur Endofit Terhadap *E. coli* dan *S. aureus*

a. Pengujian Anti Bakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Pada isolat jamur endofit yang telah tumbuh pada media PDA, diambil sedikit bagian agar yang telah ditumbuhi jamur dengan menggunakan kawat ose steril, kemudian bagian agar tersebut diletakkan pada bagian tengah medium NB yang telah diinokulasikan bakteri uji. Inkubasi dilakukan selama 1x24 jam, untuk kemudian diamati diameter zona hambat yang terbentuk.⁵

b. Pengamatan Pengukuran Zona Hambat

Pengamatan dilakukan 1x24 jam masa inkubasi. Diameter zona hambat diukur dalam satuan centimeter (cm) menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur jarak dari tepi sumur uji ke batas lingkaran zona hambat. Kemudian diameter zona hambat dikategori kekuatan daya anti bakterinya berdasarkan penggolongan oleh Davis dan Stout.⁶

E. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, grafik dan gambar.

⁵ Dewi Peti Virgianti, " Uji Antagonis Jamur Tempe (*Rhizopus Sp*) terhadap Bakteri Patogen Enterik"(jurnal STIKes Bakti Tunas Husada) (3) September 2015.

⁶*Ibid.*, Hal 214.