

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-September 2023 di Laboratorium Terpadu Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf, Laminar Air Flow (LAF), Digital Mikroscope Hirox, timbangan analitik, erlenmeyer, cawan Petri, bunsen, gelas ukur, aluminium foil, plastik wrab, pinset, mikropipet, spatula, gunting, pisau steril jarum ose, kertas saring, corong, bunsen, spektrofotometer UV-Vis, kertas label, botol kultur, botol vial, timbangan analitik, kasa, oven, kapas, corong kaca.

3.2.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel daun tumbuhan Telang (*Clitoria ternatea* L.), media Potato Dextrose Broth (PDB), Alkohol, Aquadest, NaOCl, Spiritus, Chloramphenol, , Etil Asetat, FeCl₃ 1% H₂SO₄, Methanol, Larutan DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Pycrihidrazil*), dan Asam Askorbat.

3.3 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan metode eksperimental yaitu dengan mengisolasi jamur endofit daun telang (*Clitoria ternatea* L.) untuk menguji berapa nilai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Adanya penyakit degerative dan radikal bebas menjadikan hal ini sangat diperlukan mencari sumber senyawa bioaktif baru sebagai penghasil antioksidan (Syarifah et al., 2022).

3.4 Rancangan Penelitian

Adapun rancangan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 7 perlakuan dengan konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; 31,25 ppm; 15,625 ppm, dan asam askorbat sebagai kontrol positif. Pada setiap masing-masing perlakuan, dilakukan 3 kali pengulangan.

Tujuan dilakukannya pengulangan yaitu untuk memperkecil terjadinya tingkat kesalahan yang akan terjadi di dalam penelitian.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Menurut Sugiono, (2016), variabel bebas atau sering disebut juga sebagai variabel Independen merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau munculnya variabel terikat (dependen). Adapun variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jamur endofitik yang diisolasi dari daun telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; 31,25 ppm, 15,625 ppm..

3.5.2 Variabel Terikat

Menurut Sugiono, (2016), variable terikat atau sering disebut variabel dependen merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Adapun variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu hasil analisis perhitungan aktivitas antioksidan ekstrak jamur endofitik yang di isolasi dari daun telang (*Clitoria ternatea* L.).

3.5.3 Variabel Kontrol

Menurut Sugiono, (2016), Variabel control merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti. Adapun variabel kontrol yang digunakan dalam penelitian ini yaitu asam askorbat yang digunakan sebagai control positif dalam antioksidan.

3.6 Populasi dan Sampel

3.6.1 Populasi

Menurut Sugiono, (2016), populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek/subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari kemudian ditarik kesimpulannya. Adapun populasi dalam penelitian ini yaitu jamur endofitik daun telang (*Clitoria ternatea* L.).

3.6.2 Sampel

Menurut Sugiono, (2016), sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Dimana, apa yang dipelajari dari sampel tersebut maka kesimpulannya akan dapat diberlakukan untuk populasi. Untuk itu sampel yang diambil dari populasi tersebut harus betul-betul representative (mewakili). Adapun sampel dalam penelitian ini yaitu ekstrak jamur endofitik yang diperoleh dari isolat daun telang (*Clitoria ternatea* L.).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Sterilisasi dan Pembuatan Media

a. Media PDA

Adapun pembuatan media PDA dibuat dengan cara sebanyak 42 gram lalu dilarutkan dalam 1000 ml aquades ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan dengan 100g/ml kloramfenikol. Dihomogenkan secara merata menggunakan hotplate dan strirrer. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. PDA (Potato Dextrose Agar) adalah media yang umum untuk pertumbuhan jamur dilaboratorium karena memiliki pH yang rendah (pH 4,5 sampai 5,6) sehingga menghambat pertumbuhan bakteri yang membutuhkan lingkungan yang netral dengan pH 7,0 dan suhu optimum untuk pertumbuhan antara 25-30°C (Nurul Aini, 2018)

b. Media PDB

Adapun pembuatan media Potato Dextrose Broth (PDB) cair dibuat dengan umbi kentang sebanyak 2,5 Kg yang telah dipotong dadu lalu ditambah dengan aquadest 10 Liter, Dextrose atau Glukosa sebanyak 200 Gr dan Chloramphenicol sebanyak 5 Kapsul kemudian direbus selama 2 jam. Apabila sudah homogen, saring lalu masukkan air rebusan media PDB kedalam botol vial kaca. Sehingga menghasilkan 1 Isolat dengan 5 botol berisi 450 ml PDB cair. Penggunaan Chloramphenicol berfungsi untuk mencegah adanya pertumbuhan bakteri pada media tersebut yang dapat

mengkontaminasi dan mencemari pertumbuhan jamur endofitik selama masa inkubasi. Media PDB diketahui mengandung nutrisi yang dimanfaatkan secara optimal sebagai media pertumbuhan jamur. Untuk membuat media PDB padat, 14 cawan petri dengan masing-masing 15 ml per cawannya. Maka dari itu, 210 ml media PDB ditambah agar 1,63 gr kemudian di homogenkan hingga larut.. Kemudian, media yang telah dihomogenkan dan alat-alat yang akan digunakan seperti cawan petri di masukkan ke dalam autoklaf, diatur suhu 121°C selama 15 menit (Syarifah *et al.*, 2022).

3.7.2 Isolasi jamur endofit dari daun telang (*Clitoria ternatea* L.)

Isolasi jamur endofitik diawali dengan disinfeksi permukaan daun *Clitoria ternatea* L. Sampel dicuci dengan air mengalir sampai bersih dengan lama waktu kurang lebih 5 menit. Kemudian dilakukan dengan metode tanam langsung melalui 3 tahapan yaitu direndam natrium hipoklorit (NaOCl) 3% selama 1 menit lalu direndam dalam alkohol 70% selama 3 menit, dan bilas dengan aquades selama 1 menit. Sampel yang telah disterilkan melalui 3 tahapan diatas kemudian permukaannya dipotong secara aseptik menggunakan gunting steril dengan ukuran kurang lebih 2 cm. Sampel kemudian diinokulasi pada media PDA dengan posisi permukaan bawah daun tidak menempel pada agar medium dan sedikit diberi tekanan. Inokulasi setiap cawan berisi 3 potongan daun *Clitoria ternatea*. Isolasi diinkubasi selama 3-14 hari pada suhu kamar. Pengamatan isolat dilakukan setiap hari. Koloni jamur yang tumbuh disekitar daun *Clitoria ternatea* akan memiliki ciri morfologi yang berbeda-beda mulai dari warna, ukuran, dan tekstur koloni (Syarifah *et al.*, 2022).

Dilakukan proses sterilisasi permukaan dengan perendaman material tanaman menggunakan Alkohol 70%, NaOCl, dan Aquades selama beberapa menit bertujuan untuk mengeliminasi kontaminasi mikroba pada permukaan. Waktu perendaman bervariasi tergantung jenis jaringan tanaman maupun tanaman inangnya. Diperlukan proses sterilisasi dan perendaman lebih lama untuk jaringan kayu ataupun daun dengan kutikula yang tebal (Sugijanto, 2016).

3.7.3 Pemurnian jamur endofitik

Berdasarkan isolasi yang telah dilakukan, setiap koloni jamur endofitik yang berkembang memiliki morfologi yang berbeda. Masing-masing isolat murni jamur endofitik yang telah diamati secara makroskopis tersebut, dipindahkan kedalam media PDA baru menggunakan jarum ose. Pemurnian atau peremajaan dilakukan untuk memisahkan koloni endofit murni yang memiliki morfologi yang berbeda-beda untuk dijadikan isolat endofit tunggal. Pengamatan morfologi jamur endofitik dilakukan setelah inkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang, dan apabila masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda secara makroskopik maka harus dimurnikan kembali sampai diperoleh isolat endofit tersendiri (Syarifah et al., 2022).

3.7.4 Identifikasi Jamur Endofitik

Pengamatan identifikasi jamur endofit secara mikroskopik langsung dilakukan dengan menginokulasikan jamur endofitik ke atas media PDB yang telah dipotong persegi dan diletakkan diatas object glass yang disangga oleh aluminium foil berbentuk V dan kemudian ditutup cover glass. Proses identifikasi diamati menggunakan Digital Microscope Hirox secara bertahap mulai dari hari ke-tiga, hari ke-lima, hingga hari ketujuh. Pengamatan ciri koloni dilakukan dengan mengamati warna permukaan dan sisi belakang koloni, tekstur koloni. Sedangkan pengamatan karakteristik mikroskopis dilakukan dengan mengamati hifa, spora, warna, serta bentuk konodia (bulat, lonjong, berantai, atau tidak beraturan) dibawah mikroskop (Syarifah et al., 2022). Pengamatan mikroskopik dan makroskopik kemudian diamati dengan buku identifikasi jamur seperti *Larone's Medically Important Fungi* (Walsh et al., 2018) ; *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* (Watanabe, 2002); *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Lowe & Barnett, 1960).

3.7.5 Kultivasi jamur endofitik dan Ekstraksi metabolit sekunder

Pada tahap ini, setiap isolat jamur endofitik murni yang telah diperoleh sebelumnya dikultur menggunakan media PDB dengan komposisi

20 gr dextrose monohidrat. 200 gr kentang, dan 1000 ml aquades dan dibiakan dalam 5 botol kultur 300 ml. Setiap isolat disaring dalam erlenmeyer hingga 300mL×5 Kultur kemudian diinkubasi selama 4 minggu pada suhu kamar. Media dan biomassa dipisahkan menggunakan kertas saring. Kemudian ditambahkan pelarut etil asetat ke dalam media kultur dengan perbandingan 1:1 dan diekstraksi partisi dengan 3 kali pengulangan. Ekstrak etil asetat diuapkan menggunakan oven untuk memperoleh ekstrak yang pekat pada suhu 40°C. Ekstrak pekat ditimbang dengan timbangan analitik untuk diuji anktivitas antioksidannya (Syarifah et al., 2022).

3.7.6 Uji Aktivitas Antioksidan

Pada tahap ini, aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan metode radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate). Larutan ekstrak jamur endofitik dibuat dengan melarutkan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,625 ppm. Variasi konsentrasi uji sampel dibuat dengan pengenceran larutan induk menjadi 0,2 ml. Pada 0,2 ml setiap konsentrasi ditambahkan 2 ml larutan DPPH 0,98 gr/50 ml. Kemudian dihomogenkan lalu diinkubasi selama 30 menit. Penyerapan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Pada penelitian ini, asam askorbat digunakan sebagai control positif. Aktivitas antioksidan dihitung dari laju penghambatan penyerapan DPPH dan nilai IC₅₀ (Fadhillah et al., 2019)

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_b - A_s}{A_b}$$

Keterangan :

A_k = Absorbansi Blanko

A_s = Absorbansi Sampel .

Dalam Syarifah *et al.*, (2022), setiap nilai persentase penghambatan yang diperoleh maka perhitungan yang digunakan dalam penentuan aktivitas radikal bebas selanjutnya adalah nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*), dengan rumus : $y = a_x + b$.

Keterangan :

y = 50%

a = intercept (garis potong)

b = slope (kemiringan regresi)

x = sebagai IC₅₀

3.7.8 Uji Metabolit Sekunder

A. Uji Alkaloid

Pada pengujian alkanoid, sebanyak 5 ml ekstrak jamur endofitik daun telang (*Clitoria ternatea* L.) dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah dengan beberapa tetes reagen Dragendroff. Apabila hasil yang terbentuk berupa endapan berwarna merah bata menandakan adanya reaksi positif senyawa alkaloid (Harbone 1987).

B. Uji Flavonoid

Pada pengujian senyawa flavonoid, 5 ml ekstrak jamur endofitik daun telang (*Clitoria ternatea* L.) ditambah dengan beberapa tetes asam sulfat pekat atau H₂SO₄ ke dalam tabung reaksi. Jika larutan berubah warna menjadi merah tua atau kuning jingga maka positif menandakan adanya kandungan senyawa flavonoid (Harbone, 1987).

C. Uji Saponin

Pada pengujian senyawa saponin, 5 ml ekstrak jamur endofitik daun telang (*Clitoria ternatea* L.) ditambah dengan 5 ml aquades ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, larutan tersebut dihomogenkan selama 30 detik, busa yang terbentuk didiamkan beberapa menit, apabila busa bertahan selama 30 detik maka menandakan adanya kandungan senyawa saponin (Harbone, 1987).

D. Uji Tanin

Pada pengujian senyawa tanin, 5 ml ekstrak jamur endofitik daun telang (*Clitoria ternatea* L.) ditambahkan dengan beberapa tetes FeCl₃ ke dalam tabung reaksi. Apabila terbentuk warna hijau atau biru kehitaman menandakan adanya reaksi positif senyawa tanin (Harbone, 1987).

E. Uji Fenol

Pada pengujian senyawa fenol, 5 ml ekstrak jamur endofitik daun telang (*Clitoria ternatea* L.) ditambahkan 3-4 tetes FeCl₃ ke dalam tabung reaksi. Apabila terbentuk warna hijau maka menandakan adanya reaksi positif senyawa fenol (Harbone, 1987).

3.8 Teknik Pengumpulan Data

Dalam penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data berupa pengamatan tahapan prosedur penelitian lalu menganalisis penghitungan aktivitas antioksidan. Data antioksidan pada radikal DPPH (% penghambatan) ekstrak jamur endofitik daun telang (*Clitoria ternatea* L.) dianalisis persamaan regresi linier dengan bantuan microsoft excel kemudian disesuaikan dengan kategori nilai IC₅₀.

3.9 Analisis Data

Pada analisa data antioksidan, data pengukuran absorbansi dianalisis persentase aktivitas antioksidannya dengan rumus :
$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_b - A_s}{A_b}$$
. Lalu, nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi yaitu : $y = a_x + b$. Menurut Phongpaichit *et al.*, (2007) dalam Handayani *et al.*, (2014), kategori nilai IC₅₀ sebagai berikut.

Tabel 3.1 Kategori Nilai IC₅₀

No	Nilai IC ₅₀	Kategori Antioksidan
1	<10 µg/ml	Sangat Kuat
2	11-50 µg/ml	Kuat
3	51-100 µg/ml	Sedang
4	101-250 µg/ml	Lemah
5	>251 µg/ml	Tidak Aktif