

RINGKASAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Senyawa antimikroba tidak hanya dapat dihasilkan oleh tumbuhan maupun hewan, akan tetapi dapat juga berasal dari mikroba. Salah satu yang berpotensi tersebut adalah bakteri endofit. Bakteri endofit hidup di dalam jaringan vascular tumbuhan tanpa menyebabkan efek negatif (Nursanty dan Suhartono, 2012). Mikroba endofit memiliki aktivitas biologi yang tinggi. Beberapa penelitian tentang mikroba endofit, menunjukkan bahwa mikroba endofit memiliki aktivitas biologi sebagai antimikroba, anti kanker, antimalarial, antioksidan dan antibakteri (Prihatiningtyas, 2005).

Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) mengandung senyawa kurkumin, minyak atsiri, tannin, saponin, alkaloid dan lain- lain. Senyawa tersebut bermanfaat sebagai antibakteri. Bakteri endofit yang diisolasi dari rimpang tersebut kemungkinan besar juga menghasilkan senyawa yang sama dengan tumbuhan inangnya (Radji, 2005).

Penelitian yang dilakukan melanjutkan penelitian sebelumnya yang mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit tanaman rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Hasil isolat yang didapat ada 4 isolat yaitu 2 spesies *Actinomyces viscosus* hasil isolasi dari tanaman temulawak di Batu (BT1) dan Purwodadi (PD1), *Pseudomonas stutzeri* dari Batu (BT2) dan *Bacillus brevis* dari Purwodadi (PD2) (Imawati, 2015). 4 isolat tersebut yang akan diuji antibakteri terhadap bakteri penyebab penyakit ikan yaitu *Aeromonas hydrophilla* dan *Streptococcus agalactiae*.

Penyakit yang mewabah pada budidaya ikan nila di Jawa Barat dan beberapa pulau di Indonesia pada tahun-tahun belakangan ini adalah penyakit *streptococcosis*. Penyakit tersebut disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae*, (Hardi *et al.*, 2011). Jenis penyakit bakterial ganas lain yang menyerang ikan-ikan budidaya air tawar adalah *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) atau *Haemorrhagic Septicemia*.

Adanya persoalan terkait penyakit pada ikan, menimbulkan banyak penelitian yang mencari kandidat bahan antibakteri terhadap bakteri patogen ikan yang berasal dari alam atau bahan biologi. Rimpang temulawak memiliki khasiat antibakteri yang baik karena mengandung senyawa kurkumin. Isolat yang sudah diisolasi akan dianalisis dengan bioinformatika memiliki enzim penghasil senyawa kurkumin yang kedepannya dapat dikaji lebih dalam bahwa spesies tersebut dapat menghasilkan kurkumin. Bakteri endofit rimpang temulawak diharapkan dapat menjadi antibakteri yang baik dalam membantu pengendalian penyakit ikan akibat bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophilla*.

1.1 Rumusan masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah isolat bakteri endofit rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophilla*?
2. Apakah bakteri endofit rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) memiliki enzim penghasil senyawa kurkumin?

1.2 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui bahwa isolat bakteri endofit rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophilla*.
2. Untuk mengetahui bahwa bakteri endofit rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) memiliki enzim penghasil senyawa kurkumin.

1.3 Manfaat penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut :

1. Bagi masyarakat, dapat membantu peternak ikan dalam mengatasi penyakit ikan yang disebabkan mikroba pathogen. Tentunya dengan memberikan alternatif lebih baik dari pada penggunaan obat-obatan yang memiliki efek samping.
2. Bagi peneliti selanjutnya, dapat dijadikan salah satu terobosan untuk perkembangan antibakteri yang tepat dalam pengendalian penyakit ikan secara in vitro dan dapat memberikan inovasi dalam memanfaatkan bakteri endofit hasil isolasi dalam penggunaan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan yaitu kurkumin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa menyebabkan gejala-gejala penyakit. Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman umumnya melalui akar, namun bagian tanaman yang terpapar udara langsung seperti bunga, batang dan kotiledon, juga dapat menjadi jalur masuk bakteri endofit. Mikroorganisme ini dapat hidup di dalam pembuluh vaskular atau di ruang intersel akar, batang, daun dan Jumlah bakteri endofit di dalam tanaman tidak dapat ditentukan secara pasti, namun bakteri ini dapat dideteksi dengan mengisolasi pada media agar (Desriani, 2014).

Di Indonesia satu-satunya bagian yang dimanfaatkan adalah rimpang temulawak untuk dibuat jamu godog. Rimpang ini mengandung 1,6-2,2 % kurkumin dan 1,48-1,63 % minyak asiri. Dipercaya dapat meningkatkan kerja ginjal serta anti inflamasi. Manfaat lain dari rimpang tanaman ini adalah sebagai anti mikroba. Hasil yang diperoleh pada pengujian skrining fitokimia adalah bahwa didalam rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terdapat senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid dan glikosida. Senyawa-senyawa tersebut dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri. Senyawa kurkumin termasuk golongan fenolik dan terdapat lebih banyak kadarnya dari senyawa hasil fitokimia lain pada temulawak. (Hayani, 2006).

Kurkumin memiliki cara penghambatan mikroba pathogen. Senyawa fenolik mampu merusak dan menembus dinding sel bakteri kemudian mengendapkan protein sel mikroba. Senyawa kurkumin dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba yang tepat (Wientarsih, 2013).

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dan eksplorasi. Penelitian ini menguji isolat bakteri endofit rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophilla* yang memiliki kemampuan menghasilkan senyawa aktif sebagai antibakteri sebagai upaya pengendalian penyakit ikan. Dilakukan dengan metode difusi kertas (*paper disc diffusion*) secara *in vitro* dan melihat bahwa isolat endofit sebagai penghasil enzim senyawa aktif berupa kurkumin dengan bioinformatik secara *in silico*.

Langkahnya adalah bakteri endofit yang diremajakan ada tiga spesies yaitu *Actinomyces viscosus*, *Bacillus brevis* dan *Pseudomonas stutzeri*. Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan seperti: jarum ose, bunsen, media lempeng NA (Nutrient Agar), plastik wrab dan bakteri endofit yang akan diremajakan. Jarum ose dipijarkan di api bunsen, setelah mendingin diambil satu ose bakteri endofit. Di tanam pada media lempeng NA yang sudah memadat dengan metode cawan gores (*streak plate*). Semua yang sudah ditanam diberi label dan di beri plastik wrab. Diinkubasi dalam inkubator 37 °C selama 2x24 jam.

Produksi metabolit antibakteri oleh bakteri endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya di dalam media MHB (Muller-Hinton broth). Koloni bakteri endofit yang telah diinkubasi pada media lempeng NA selama 24 – 48 jam pada suhu 35 °C, diambil satu sengkeli dan dipindahkan ke dalam 5 ml media Mueller-Hinton Broth (MHB), kemudian dilarutkan sampai mencapai kekeruhan 0,5 McFarland (Lampiran 7). Suspensi koloni bakteri endofit dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam 9 ml medium MHB pada tabung ependof 12 ml, diinkubasi pada suhu 30°C menggunakan shaker inkubator 130 rpm selama 16 jam

(*Pseudomonas stutzeri*) dan 48 jam (Selain *Pseudomonas stutzeri*). Proses fermentasi selesai, setelah itu masing-masing medium pertumbuhan di sentrifugasi 5000 rpm, 4°C, selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh dipergunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri. Bakteri *A. Hydropila* dan *S. Agalactiae* diremajakan masing – masing dengan cara yang sama sebagaimana bakteri endofit.

Metode ini dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 ml bakteri uji ke dalam 10 ml media MHA steril suhu 40-45°C. Kemudian dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam di dalam 50 µl supernatan kultur bakteri endofit selama 1 jam. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktivitas antimikroba (media lempeng MHA). Sebagai kontrol positif digunakan cakram yang direndam amoxicilin 1% dan kontrol negatif digunakan cakram kosong steril kemudian, diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37°C. Masa inkubasi selesai, setelah itu dilakukan pengukuran terhadap zona bening yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening (Simarmata, 2007).

Zona hambat yang terbentuk diamati disekitar isolat yang diuji, karena luasan zona bentuknya maka luas zona hambat diitung dengan rumus sebagai berikut (Simarmata, 2007):

$$Lz = Lav - Ld$$

Dimana:

Lz = Diameter zona hambat (mm)

Lav = Diameter zona hambat dengan kertas saring (mm)

Ld = Diameter kertas saring (mm)

Urutan protein dari enzim yang dapat menghasilkan senyawa kurkumin bisa dicari di KEGG, yaitu dicari *pathway Curcumin biosynthesis* dan dilihat enzim yang berperan dalam menghasilkan senyawa kurkumin. dicari urutan *neuklotide whole genome* dari masing – masing spesies bakteri yang akan diBLAST di NCBI, *all database* diganti *genome* dan dipilih *assembly gene* kemudian dilihat nama spesies termasuk kodenya dan di copy agar saat diBLAST memudahkan untuk memilih nama organisme dengan *complete genome*. Masuk pada teknik BLAST di NCBI dan dimasukkan hal – hal yang harus diisi dibagian NCBI untuk diBLAST yaitu hasil copy dari fasta urutan asam amino enzim dan *sequence whole genome* yang ingin diBLAST. Pilih BLAST p untuk BLAST protein dan BLAST n untuk BLAST nukleotida kemudian di klik *show result*, lalu klik BLAST (Felix, 2011).

Hasil yang diperoleh dilihat persentase *query cover* $\geq 80 \%$, *identity* $\geq 30 \%$ bisa dinyatakan memiliki kesamaan. Bagian-bagian dari kedua sekuen yang tidak dihubungkan suatu garis vertical, menunjukkan letak perbedaan dari kedua sekuen tersebut (Narita, 2012).

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pengamatan dilakukan setelah bakteri *Aeromonas hydrophilla* dan *Streptococcus agalactiae* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, diameter zona hambat dari uji aktifitas antibakteri bakteri endofit dari rimpang temulawak terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla* dan *Streptococcus agalactiae* dapat dilihat pada 4.1.

Tabel 4.1 Zona hambat pada uji aktifitas metabolit skunder mikroba endofit terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla* dan *Streptococcus agalactiae*

Kode Isolat	/Spesies	Zona hambat (dalam mm)			
		<i>Aeromonas hydrophilla</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i>	
		Panjang	Keterangan (Pan, <i>et al.</i> , 2009)	Panjang	Keterangan (Pan, <i>et al.</i> , 2009)
BT1	<i>Actinomyces viscosus</i>	3,83	Sedang	3,86	Sedang
BT2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5,6	Sedang	5,5	Sedang
PD1	<i>Actinomyces viscosus</i>	4,23	Sedang	3,9	Sedang
PD2	<i>Basillus. Brevis</i>	3,74	Sedang	3,64	Sedang
	Kontrol Positif (Amoxicilin 1 %)	14,18	Kuat	14,86	Kuat
	Kontrol Negatif (Cakram steril)	0	Lemah	0	Lemah

Keterangan: BT1=Isolat rimpang dari Batu, BT2=Isolat rimpang dari Batu, PD2=Isolat rimpang dari Purwodadi

Berdasarkan hasil BLAST protein dan nukleotida enzim penghasil kurkumin dan spesies bakteri endofit tidak homolog. Bakteri endofit tidak memiliki enzim penghasil kurkumin. Bila dilihat dari ketiadaan enzim penghasil kurkumin, spesies bakteri tersebut tidak bisa dikatakan menghasilkan senyawa kurkumin yang sama dengan inangnya.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dipeloreh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 4 isolat bakteri endofit rimpang temulawak yaitu spesies *Actinomyces viscosus* dan *Pseudomonas stutzeri* dari Batu, *Actinomces viscosus* dan *Bacillus brevis* dari Purwodadi dapat menghambat bakteri *Aeromonas hydrophilla* dan *Streptococcus agalactiae*.
2. Berdasarkan hasil BLAST protein dan nukleotida enzim penghasil kurkumin dan spesies bakteri endofit tidak homolog. Bakteri endofit tidak memiliki enzim penghasil kurkumin.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil dari penelitian dapat dikemukakan beberapa saran sebagai berikut:

1. Melakukan Uji antibakteri metabolit sekunder bakteri endofit rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap bakteri pathogen lain yang perlu dihambat pertumbuhannya.
2. Melakukan sequencing DNA bakteri endofit untuk mendapatkan DNA hasil sequencing dari masing – masing bakteri endofit dan dilanjutkan dengan BLAST nukleotida sehingga, didapatkan hasil yang lebih tepat dalam pensejajaran DNA.