

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis 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*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Juni 2015. Bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Obyek Penelitian

Obyek penelitian adalah bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophilla* biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan kelautan Universitas Brawijaya. Isolat bakteri endofit temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) yaitu *Bacillus brevis*, *Pseudomonas stutzeri* dan *Actinomyces viscosus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universtas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian.

3.4.1 Alat Penelitian

3.4.1.1 Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Seperangkat alat gelas, jarum ose, aluminium foil, bunsen, *laminar air flow*, mikroskop, autoclave, hot plate, tube-stirer, shaker incubator, sentrifuse, eppendorf tube, mikropipet, refrigerator, vortex, micro centrifuse, pinset, neraca analitik, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm, jangka sorong.

3.4.1.2 Mengkaji Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Memiliki Enzim Penghasil Senyawa Kurkumin

Alat yang dibutuhkan adalah seperangkat alat komputer/laptop. Jaringan internet yang cukup sangat dibutuhkan. Peralatan tulis dibutuhkan untuk mencatat hal – hal yang penting.

3.4.2 Bahan Penelitian

3.4.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri endofit temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dan biakan murni bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas Hydrophilla*. Media MHB (Muller Hinton Broth), media MHA (Muller Hinton Agar), media NA (Natrium Agar), media TSA (Tryptone Soya Agar), media NB (Nutrient Broth), amoxicilin sebagai antibakteri, aquades, alkohol

70 % dan kertas saring Whatman 0,22 μm , kertas cakram, spirtus, tisu, plastik, karet, kain kasa, plastik wrap dan kertas label.

3.4.2.2 Mengkaji Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Memiliki Enzim Penghasil Senyawa Kurkumin

Bahan yang dibutuhkan adalah program NCBI, uniprot, dan KEGG. Membukanya bisa melalui google. Teknik BLAST dibuka di NCBI atau Uniprot.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Uji Aktifitas Antibakteri Bakteri Endofit Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat (hanya alat yang bisa dibungkus) dengan alumunium foil, kertas kemudian dimasukkan plastik, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf . Autoklaf dinyalakan hingga mencapai suhu 121°C, kemudian dibiarkan selama 15 menit untuk membunuh kontaminan yang kemungkinan dapat mengkontaminasi alat ataupun medium. Tekanan pada autoklaf yaitu 1 atm (Hadioetomo, 1993)

3.5.1.2 Peremajaan Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

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 (Lampiran 3).

3.5.2 Fermentasi Produksi Metabolit Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

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 sengkelit 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.

3.5.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen Pada Ikan

- Persiapan bakteri uji

Bakteri *A. Hydrophila* dan *S. Agalactiae* diremajakan masing – masing dengan cara menggoreskan jarum ose yang mengandung bakteri *A. Hydrophila*

pada 1 cawan petri yang berisi media TSA dan *S. Agalactiae* pada petri yang lainnya secara aseptis. Setelah itu dinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37°C (Lampiran 4). Bakteri yang telah diremajakan diambil biakannya menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml media NB (Nutrient Broth). Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi yang terbentuk disetarakan dengan larutan baku Mc. Farland 0.5 yang ekuivalen dengan suspensi sel bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml (Andrews, 2008) (Lampiran 7).

- **Metode difusi kertas (*paper disc diffusion*)**

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).

3.5.2.2 Pengukuran Zona Hambat

Zona hambat yang terbentuk diamati disekitar isolat yang diuji, karena luasan zona bentuknya maka luas zona hambat dihitung 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)

3.5.3 Mengkaji Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Memiliki Enzim Penghasil Senyawa Kurkumin

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. Deskripsinya dibuka dan dilihat urutan nukleotida dan proteinnya disimpan melalui fasta di notepad. Urutan nukleotida dan protein sudah ditemukan, setelah itu 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 *complate genome*. Masuk pada teknik BLAST di NCBI dan

dimasukan 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).

3.5.4 Analisis Data

3.5.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Data yang diperoleh hasil uji aktivitas antibakteri dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk, pengumpulan data dilaksanakan sebagai berikut: mengukur zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat adalah diameter yang tidak ditumbuhi oleh bakteri di sekitar paper disk dikurangi diameter paper disk (Simamarta, 2007).

3.5.4.2 Bakteri Endofit Memiliki Enzim Penghasil Senyawa Kurkumin

Hasil yang diperoleh dilihat persentase *query cover* ≥ 80 %, *identity* ≥ 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).