

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan eksperimen. Eksplorasi dan eksperimen dengan cara mengisolasi dan identifikasi mikroba endofit dari rimpang tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) yang diambil dari kebun warga di daerah Batu dan Purwodadi, kemudian diuji isolat mikroba endofit terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis* yang mempunyai kemampuan menghasilkan senyawa aktif sebagai antibakteri.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang dimulai pada bulan Juli 2014 – Januari 2015.

3.3 Obyek Penelitian

Obyek penelitian adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri *Staphylococcus epidermidis* biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) yang didapat dari kebun milik bapak Abdul Ghoni Jalan Wukir RT/RW 002/004 Desa Temas Kecamatan Batu dan kebun milik bapak Kusein Jalan Nongkojajar RT/RW 002/002 Dusun Borong Desa Coret Kecamatan Purwodadi.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar air flow cabinet, autoklaf, cawan petri, jarum ose, bunsen, kompor listrik, pengaduk kaca, pinset, kertas saring, inkubator, alumunium foil, mikroskop, cover glasss, gelas obyek, gelas ukur, tabung reaksi, botol media, erlenmeyer, jangka sorong, shaker inkubator, sentrifugasi, timbangan analitik dan pisau.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhizza*) dan biakan murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri *Staphylococcus epidermidis*, media Nutrient Agar (NA), media Nutrient Broth (NB), media Muller-Hinton Broth (MHB), media Muller-Hinton Agar (MHA), aquades, alcohol 70%, etanol 75% dan sodium hipoklorit (NaOCl) 5,3%, larutan antifungi, kertas saring Whatman 0,22 μ m, kertas cakram, pewarnaan gram (larutan gentian violet, larutan iodium, larutan safranin, alkohol 96%, mikrobact, kapas, spirtus, tisu.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1` Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat (hanya alat yang bisa dibungkus) dengan alumunium foil, kemudian dimasukkan ke dalam

autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inch*) selama 15 menit.

3.5.2 Isolasi Bakteri Endofit dari Rimpang Temulawak

Rimpang temulawak di cuci menggunakan air mengalir selama 3 menit, kemudian di kupas bagian luarnya. Dipotong dan ditimbang sebanyak 1 gram. Tiap satu gram temulawak ini disebut dengan sampel. Selanjutnya sampel direndam di larutan etanol 75% sebanyak 10 ml selama 3 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan sodium hipoklorit (NaOCl) 5,3% sebanyak 10 ml selama 3 menit, di rendam kembali menggunakan larutan etanol 75% sebanyak 10 ml selama 3 menit dan diterakhir direndam di larutan antifungi sebanyak 10 ml selama 1 menit setelah itu dibilas menggunakan aquades selanjutnya dimasukkan cawan petri steril. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam media nutrient agar sebagai kontrol penelitian. Sampel yang lainnya dipotong longitudinal didalam cawan petri dalam keadaan steril. Bagian dalam potongan tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media nutrient agar kemudian diinkubasi selama 24-48 jam Pada suhu 35°C (suhu kamar). Diamati setiap 5 jam sekali untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri. Hasil inkubasi yang menunjukkan adanya koloni mikroba di murnikan pada cawan petri berisi media natrium agar baru. Mikroba endofit yang digunakan dalam penelitian adalah mikroba yang tumbuh pada belahan kulit dan rimpang bagian dalam (Strobel, 2000).

3.5.3 Pemurnian Mikroba Endofit

Medium yang digunakan dalam pemurnian mikroba endofit yaitu medium nutrient agar. Mikroba endofit yang tumbuh pada medium nutrient agar, dimurnikan masing-masing pada medium lempeng nutrient agar kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam. Setelah masa inkubasi selesai, koloni yang tampak pada masing-masing cawan petri diamati. Koloni yang memiliki bentuk dan warna yang sama dianggap sebagai isolat yang sama. Setiap koloni kemudian dipindahkan ke medium nutrient agar dengan cara menggosokkan koloni tunggal mikroba dengan metode *streak kuadran* dan diinkubasi selama 24 jam. Bila masih ditemukan beberapa bentuk koloni maka dilakukan pemisahan kembali hingga diperoleh isolat murni. Isolat bakteri endofit yang didapat dibuat pada media agar miring sebanyak dua tabung per-isolate, masing-masing digunakan sebagai *working culture* (kultur kerja) dan *stock culture* (kultur stok) (Lampiran 3).

3.5.4 Identifikasi Bakteri Endofit

Bakteri murni yang telah diisolasi kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2005), karakterisasi yang dilakukan meliputi :

3.5.4.1 Pengamatan makroskopik

Karakteristik koloni bakteri hasil isolasi yaitu berdasarkan (Bergey's, 2005):

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumpanan.
- b. Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
- c. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

3.5.4.2 Pengamatan mikroskopik

Pengamatan mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat. Pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan gram, uji katalase, dan uji endospora. Untuk penentuan jenis bakteri dilanjutkan dengan serangkaian uji biokimia terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*.

3.5.4.2.1 Pewarnaan Gram

Bakteri endofit diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan larutan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan alkohol 96% sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat

ditetesi dengan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop, uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1985). Berdasarkan warna Gram, dilakukan uji biokimia untuk identifikasi lanjut. Uji dengan Microbact dilakukan terhadap bakteri berbentuk gram negatif yang sebelumnya telah dilakukan tes oksidase memakai oksidase strip (hasil positif memberikan warna biru-ungu). Bakteri gram negatif berbentuk batang dan oksidase positif, diuji dengan Microbact 12E dan 12B, sedangkan yang hasilnya menunjukkan oksidase negative dengan Microbact 12E saja. Satu sengkeli isolate bakteri endofit dimasukkan kedalam 5-10 ml NaCl 0,85% kekeruhan 0,5 McFarland, kemudian suspensi bakteri dimasukkan ke dalam sumuran Microbact dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 16-24 jam. Kemudian hasilnya didapat dengan cara membandingkan dengan warna yang ada dalam tabel dan memasukkan datanya ke komputer yang telah di program dalam file Mikroba (Lampiran 7, 8, 9 dan 10).

3.6. Uji Bakteri Endofit Penghasil Metabolit Antibakteri

3.6.1 Persiapan Inokulum Mikroba Endofit Rimpang Temulawak

Pembuatan inokulum ditentukan dengan menggunakan perbandingan kekeruhan Mc Farland 0,5. Inokulum dibuat dengan menambahkan biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang berumur 24 jam kedalam 3 ml larutan NaCl 0,85% kemudian suspense dibandingkan dengan kekeruhan larutan Mc Farland 0,5. (Rosenblatt 1980).

3.6.2 Produktifitas Metabolit Antibakteri

Produksi metabolit antibakteri oleh bakteri endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya di dalam medium nutrient agar, koloni bakteri endofit yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C, diambil satu koloni bakteri endofit dan dipindahkan ke dalam 5 ml medium Muller-Hinton Broth (MHB), kemudian dilarutkan memakai tube-stirrer sampai mencapai kekeruhan 0,5 McFarland. Suspense bakteri endofit dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam 9 ml medium MHB pada tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 30°C menggunakan shaker inkubator 130 rpm selama 16 jam dan 18 jam (fase akhir log tiap spesies). Setelah selesai, masing-masing medium pertumbuhan disentrifugasi dengan kecepatan 2000g (3800 rpm) pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan diambil menggunakan kertas saring Whatman 0,22 µm. Supernatan yang diperoleh dipergunakan dalam pengujian aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*

3.6.3 Uji Aktifitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*

3.6.3.1 Pembuatan Mikroba Uji

Biakan murni bakteri diremajakan pada media agar padat dengan cara bakteri diambil 1 ose lalu jarum ose yang mengandung bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* digoreskan secara aseptis pada media nutrisi agar pada cawan yaitu dengan mendekatkan cawan pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Kemudian cawan petri ditutup kembali dan diinkubasi

selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, kemudian diambil 1 koloni dan ditanam dalam media nutrient broth sampai mencapai kekeruhan 0,5 McFarland.

3.6.3.2 Uji Antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Medium yang digunakan untuk uji aktifitas antibakteri yaitu medium Mueller Hinton Agar. Uji aktifitas antibakteri mikroba endofit terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan metode uji Kirby-Bayer menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas saring Whatman dengan cara mengguntingnya dengan alat pembolong kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 7 mm. Simarmata (2007) secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam dalam 50 µl supernatan kultur bakteri endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktifitas antibakteri (medium plat MHA). Kemudian diinkubasi sekama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap zona jernih yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri dengan adanya zona hambat zona jernih.

Sebagai kontrol positif digunakan amoxcylin dan kontrol negatif digunakan cakram kosong steril kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengukuran terhadap zona jernih yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona jernih.

3.7 Pengukuran Zona Hambat

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 = Luas zona hambat (mm)

Lav = Luas zona hambat dengan kertas saring (mm)

Ld = Luas diameter kertas saring (mm)

3.8 Analisa Data

Data yang diperoleh 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.