

### III. METODELOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan November 2013 sampai dengan Maret 2014 di Laboratorium Penyakit Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Unila, Laboratorium Biokimia FMIPA Unila dan Laboratorium Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Serpong, Tangerang Selatan.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer (Spectrophotometer Genesys 20), ultrasonicator, mikropipet, cawan petri, tabung reaksi, botol falcon steril, autoklaf (S-90-N Electric Steroclave), bunsen, timbangan digital (Ainswot AA-160, Denver Instrument Company) *hot plate stirrer* (Noma II Thermolyne), labu erlenmeyer, kapas, kain kassa, aluminium foil, *sprayer*, pipet tetes 10 ml, botol sampel, rak tabung reaksi, tabung falcon, instrumen sentrifus (Model 228 Fisher Scientific), Shaker (SSL2 Stuart), Inkubator (Precistern P>Selecta) dan jarum ose labu ekstraksi. Bahan yang digunakan yaitu, isolat bakteri D2.2, isolat bakteri *Stapylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, alkohol, akuades, air laut steril, kertas cakram, media *sea water complete* (SWC) bacto peptone (OXOID LP0034, England), bacto agar (OXOID LP0011, England), Ekstrak yeast (OXOID CM0019, England) media TSA (OXOID CM0131, England), antibiotik *oxytetracycline* (Indofarma, Bekasi), etil asatat dan amonium sulfat.

### **3.3 Isolat Bakteri D2.2**

Isolat bakteri D2.2 murni dari koleksi hasil penelitian sebelumnya Mariska *et al.* (2013), yang diisolasi dari tambak tradisional di Lampung Timur. Isolat ini kemudian disegarkan kembali menggunakan media SWC.

### **3.4 Pembuatan Media**

#### **3.4.1 Komposisi Media *sea water complete* (SWC)**

Media yang digunakan adalah media cair *sea water complete* (SWC) dalam 1 liter dengan komposisi bacto peptone 5 g, ekstrak yeast 1 g, gliserol 3 ml, air laut 75%, akuades 25%. Media agar SWC padat dibuat dengan menambahkan 15 gram bacto agar dan untuk media SWC semi solid ditambahkan 7,5 gram bacto agar (Ayuzar, 2008).

#### **3.4.2 Cara Pembuatan Media SWC**

Semua bahan komposisi media SWC dicampurkan kedalam labu erlenmeyer, kemudian dipanaskan dan diaduk menggunakan *hot plate stirrer*. Media yang telah homogen kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Kemudian media dimasukkan ke dalam cawan petri untuk media agar lempeng. Setelah itu inkubasi terbalik selama 24 jam pada suhu ruang. Untuk media agar miring, media agar SWC dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

### **3.5 Metode penelitian**

#### **3.5.1 Fase Pertumbuhan Bakteri**

Pada penelitian ini diperlukan perhitungan untuk menentukan kurva pertumbuhan bakteri. Sebanyak dua ose isolat bakteri ditumbuhkan dalam 100 ml media SWC cair dan diinkubasi pada inkubator suhu ruang. Pengukuran kerapatan sel (*Optical Density*, OD) dilakukan setiap 3 jam sekali dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm hingga fase kematian.

#### **3.5.2 Produksi Substansi Antibakteri**

Ekstraksi anti bakteri mengacu pada Isnansetyo *et al.* (2009), dengan modifikasi yaitu media fermentasi SWC cair sebanyak 400 ml dibagi menjadi dua tempat dan diinkubasi menggunakan *rotary shaker* selama 84 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm. Setelah diinkubasi kemudian disentrifugasi pada dengan kecepatan 5000 rpm selama 25 menit untuk memisahkan supernatan dengan pelet sel bakteri.

Supernatan dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama diekstraksi menggunakan etil asetat sebanyak dua kali kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50<sup>0</sup>C. Bagian kedua disaturasi menggunakan amonium sulfat dan diletakan pada lemari dingin selama 12 jam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 25 menit untuk diambil presipitat atau peletnya.

Pelet sel bakteri dicuci menggunakan *phospat buffer saline* (PBS) dan ditambahkan 15 ml *buffer* yang sama. Suspensi sel bakteri kemudian dipecah

menggunakan ultrasonicator selama 30 detik sebanyak 6 kali. Suspensi sel bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 25 menit untuk diambil supernatnya. Supernatan dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama ditambahkan akuades 100 ml kemudian diekstraksi menggunakan etil asetat sebanyak dua kali dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50<sup>0</sup>C. Bagian kedua disaturasi menggunakan amonium sulfat dengan perlakuan yang sama seperti sebelumnya.

### **3.5.3 Uji Aktifitas Senyawa Antibakteri**

Uji aktifitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi (*diffusion test*) menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dengan diameter 6 mm direndam dengan hasil ekstraksi dan saturasi sebanyak 0,5 ml selama 1 jam. Kontrol positif menggunakan antibiotik *oxytetracycline* sedangkan kontrol negatif direndam menggunakan aquades. Sebanyak 2 ose isolat bakteri uji yaitu *Stapylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, diencerkan masing-masing dalam 1 ml aquades steril. Bakteri dimasukkan kedalam cawan petri kemudian ditambahkan media TSA dan digerakan menyerupai angka delapan sehingga media bercampur rata dengan bakteri dan ditunggu hingga membentuk agar. Masing-masing kertas cakram yang sudah kering diletakan diatas permukaan media TSA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, diamati dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram tersebut.

### 3.5.4 Identifikasi Bakteri Menggunakan Analisis Sekuen 16S rDNA

Pada penelitian ini metode yang digunakan dalam analisis sekuen DNA mengacu pada metode Sambrook *et al.* (1999), yaitu:

#### 1. Persiapan larutan pengeskrak

Larutan pengekrak dibuat dengan menyiapkan SDS 10%, Phenol, NaOAc 3 M, dan Solution I. Cara pembuatan Solution I yaitu dengan mencampurkan larutan dengan konsentrasi 50 mM glucose, 25 mM tris-HCl, dan 10 mM EDTA, kemudian larutan disterilisasi dengan cara diautoklav dan disimpan pada suhu 4°C.

#### 2. Ekstraksi

Kultur bakteri dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit, kemudian di buang supernatannya. Tambahkan 400 µl Larutan I (50mM Glukose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit). Kemudian ditambahkan 100 µl Lysozim 2 mg/ml dan di inkubasi dalam es selama 10 menit dan di tambahkan 50 µl 10% SDS. Rotamix selama 10 menit atau sampai bening dan di tambahkan 550 µl Phenol, rotamix kembali selama 10 menit dan di sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm, dengan suhu 4°C, selama 5 menit.

#### 3. Purifikasi

Purifikasi dilakukan dengan menambahkan 1/10 3 M volume NaOAc kemudian di sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 3 menit. Tambahkan 2 kali volume EtOH 100% kemudian di rotamix. Di simpan pada suhu -20°C selama 30 menit. Sentrifugasi pada kecepatan 5000

rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Buang supernatannya dan keringkan (*vacuum dry*). Kemudian ditambahkan 100 µl TE buffer dan 1 µl RNase 1 mg/ml, dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian di simpan pada suhu -20°C.

Untuk mengetahui tingkat homologi bakteri D2.2, hasil sekuen di *up load* menggunakan aplikasi Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) pada GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses pada alamat [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) untuk dapat diketahui bakteri yang memiliki tingkat homologi paling tinggi dengan bakteri D2.2.

Pohon filogenetik bakteri dibuat menggunakan aplikasi online Clustal Omega yang dapat diakses pada website European Bioinformatic Institute (EBI) yaitu pada alamat <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Sekuen dari bakteri D2.2 dalam kemudian dibandingkan dengan sekuen bakteri yang memiliki homologi paling tinggi dengan bakteri D2.2 yang dapat diakses pada GenBank di National Center for Biotechnology Information (NCBI). Kemudian di *up load* dalam format FASTA. Setelah data filogenetik didapatkan yaitu dengan format phylip (\*.ph), kemudian dibaca menggunakan aplikasi Tree View X dan dan dimodifikasi sesuai kebutuhan tampilan pohon filogenetik.