

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Januari 2017 hingga September 2017. Sampel tanah diambil dari tanah Hutan Universitas Brawijaya (*UB Forest*), Karang Ploso, Malang. Sampel dianalisis di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan dan Laboratorium Biologi Molekular, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.



Gambar 4. Ilustrasi lokasi pengambilan sampel melalui *Google earth*

### 3.2. Pengambilan Sampel Tanah dan Analisis Fisika-Kimia tanah

Sampel tanah diambil menggunakan bor tanah yang telah dibersihkan dengan etanol 70 %. Sampel tanah diambil dari bagian tanah rhizosfer yaitu tanah yang dekat dengan zona akar dari pohon Pinus dengan kedalaman 0-5 cm kemudian disimpan di dalam kantong plastik (Golińska & Hanna, 2011; Muharram dkk., 2013). Masing-masing tanah diambil secara acak dari lima pohon Pinus kemudian dilakukan komposit dan diulangi sebanyak lima kali. Sampel tanah

kemudian dimasukkan ke dalam *ice box* dan dianalisis lebih lanjut di laboratorium.

Parameter lingkungan tempat pengambilan sampel tanah seperti intensitas cahaya, temperatur, koordinat lokasi dan keliling pohon Pinus diukur menggunakan alat berupa luxmeter, termometer, GPS dan meteran. Sifat fisiko-kimiawi sampel tanah dianalisis pH, kelembaban tanah dan bahan organik tanah. Keasaman tanah diukur dengan mengambil sampel tanah sebanyak 10 g dan ditambahkan ke dalam 20 mL akuades kemudian diaduk hingga homogen dan dibiarkan selama 30 menit sampai mengendap. Sampel tanah yang sudah mengendap kemudian diukur dengan memasukkan *probe* pH meter dan nilai pH yang terukur kemudian dicatat (Carter & Gregorich, 2007).

Kelembaban tanah diukur dengan menimbang tanah sebanyak 10 g dalam cawan porselin dan dikeringkan di oven dengan suhu 105 °C selama 24 jam. Berat sampel tanah ditimbang sebagai berat kering hingga mencapai berat kering yang konstan. Kelembaban tanah dapat dihitung dengan persamaan 1 (DeAngelis, 2007). Kadar organik tanah secara sederhana diukur dengan pengabuan. Sampel tanah kering diayak menggunakan ayakan berlubang 2 mm, kemudian dihaluskan. Tanah ditimbang sebanyak 2 g dan diletakkan ke dalam cawan porselin kemudian dibakar di dalam tungku (*furnace*) dengan suhu 500 °C. Tanah kemudian ditimbang kembali dan bahan organik tanah dihitung dengan persamaan 2 (Combs & Nathan, 1998; Robertson, 2011).

$$\text{Berat kering} = \frac{(Wt-wt)}{(Wt-w)} \times 100$$

$$\text{Kelembaban (\%)} = 100 \% - \% \text{ berat kering} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

Wt = berat tanah dan berat cawan sebelum dikeringkan (g)

wt = berat tanah dan berat cawan sesudah dikeringkan (g)

w = berat cawan (g)

$$\text{Bahan organik (\%)} = (a - b) \cdot (a)^{-1} \times 100 \% \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan:

a = berat tanah sebelum dibakar (g)

b = berat tanah sesudah dibakar (g)

### 3.3. Isolasi *Actinomyces*

Sampel tanah diberikan *pre-treatment* dengan dipanaskan pada suhu 50 °C selama satu jam dengan tujuan untuk menyeleksi populasi *Actinomyces* yang bersporulasi dalam sampel (Evangelista & Marti'nez, 2013). Sampel tanah sebanyak 25 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berisi 225 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %). Sampel selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Suspensi dari sampel diambil untuk dilakukan dilusi (pengenceran) berseri hingga pengenceran  $10^{-6}$ . Masing-masing suspensi sampel dalam pengenceran dari tabung diambil sebanyak 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam Cawan Petri steril (Rahman dkk., 2011). Medium pertumbuhan *Actinomyces* yaitu medium *Starch Casein Agar* (SCA) dituangkan ke dalam Cawan Petri dengan metode *pour plate*. Medium pertumbuhan ditambahkan dengan antifungi *Nystatin* sebanyak 100 ppm. Medium SCA tersusun atas pati 10,0 g, *Casein hydrolysate* 0,3 g,  $KNO_3$  2,0 g, NaCl 2,0 g,  $K_2HPO_4$ , 2,0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01 g, Agar, 18,0 g per liter (Jeffrey, 2008; dalam Khasabuli & Anthony, 2014). Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu 28 °C selama 10-14 hari untuk menumbuhkan *Actinomyces*. Karakteristik koloni *Actinomyces* yang tumbuh selanjutnya diamati dan dilakukan pemurnian dengan metode dilusi dan *spread plate*. Isolat murni yang didapatkan dilakukan proses pengamatan secara mikroskopik dengan menggunakan mikroskop.

### 3.4. Skrining dan Uji Potensi *Actinomyces* dalam Menghasilkan Antibiotik

Skrining dan uji potensi *Actinomyces* dalam menghasilkan antibiotik dilakukan untuk memperoleh isolat *Actinomyces* yang memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri patogen. Skrining dan uji potensi dilakukan melalui uji antagonis antara isolat *Actinomyces* dengan bakteri patogen sehingga dapat diketahui kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen. Uji antagonis dilakukan dengan menggunakan bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan MRSA. Tahapan uji antagonis dilakukan dengan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan tiga ulangan pada setiap perlakuan.

Isolat *Actinomycetes* yang telah diperoleh, selanjutnya diuji daya hambatnya terhadap bakteri dengan parameter yang diamati adalah diameter zona hambat (zona bening) yang dibentuk oleh isolat *Actinomycetes*.

Uji antagonis secara *in vitro* dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan MRSA yang ditumbuhkan dalam media NB (*Nutrient Broth*). Isolat *Actinomycetes* disubkultur pada media SCB (*Starch Casein Broth*) sebanyak 50 mL sebagai starter dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 7 hari. Masing-masing suspensi kultur isolat *Actinomycetes* yang telah diinkubasi dengan densitas 10<sup>7</sup> cfu/mL diinokulasikan sebanyak 20 µL ke kertas cakram (Whatman no.1) dengan diameter ±5 mm dan didiamkan hingga kering. Ketiga bakteri patogen (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan MRSA) ditumbuhkan pada media NB (*Nutrient Broth*) dengan kondisi sama (10<sup>7</sup> sel/mL; 0,1 mL) *dispread plate* pada Cawan Petri berisi media NA (*Nutrient Agar*) kemudian didiamkan selama 1 jam dalam lemari es hingga kering. Kertas cakram diletakkan di atas permukaan Agar dan didiamkan selama 30 menit dalam lemari es hingga kering. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam (Oskay, 2009; Usha dkk., 2012). Terbentuknya zona hambat berupa zona bening di sekitar cakram diamati kemudian diukur dan dianggap positif bila zona hambatnya kurang lebih berukuran 3 mm (Alharbi dkk., 2012; Evangelista & Marti'nez, 2013). Isolat *Actinomycetes* yang membentuk zona hambat pada bakteri patogen dianggap memiliki aktivitas antimikroba dan memiliki kemampuan untuk menghasilkan antibiotik khususnya dalam menghambat bakteri patogen MRSA (Anti-MRSA). Data yang diperoleh dianalisis ragam dengan  $\alpha \leq 0,05$ , hasil yang berbeda nyata dilakukan uji lanjutan. Data dianalisis dengan menggunakan *software* SPSS 17.0 *for windows*.

### **3.5. Kurva Pertumbuhan Isolat *Actinomycetes***

Kurva pertumbuhan *Actinomycetes* dibuat dari isolat *Actinomycetes* potensial yang disubkultur pada media SCB sebanyak 50 mL sebagai starter dan diinkubasi selama 10 hari dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm. Kultur diambil sebanyak 5 mL dan dinokulasikan ke dalam 95 mL media SCB. Kurva standard dibuat dari kultur dengan perbandingan media:kultur 0:8; 1:7; 2:6; 3:5; 4:4; 5:3; 6:2; 7:1; 8:0. Kurva pertumbuhan diamati setiap 24 jam selama 10

hari. Pengamatan dilakukan dengan mengukur nilai kerapatan optik (*optical density*, OD) pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer. Nilai OD yang diperoleh menunjukkan sebagai konsentrasi sel yaitu jumlah sel *Actinomycetes* yang terdapat dalam medium pertumbuhannya. Jumlah sel dihitung menggunakan haemositometer yang kemudian digunakan untuk menghitung laju pertumbuhan sel *Actinomycetes*. Nilai OD digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan untuk mengetahui umur bakteri pada fase stasioner yang memproduksi metabolit sekunder dan digunakan untuk uji selanjutnya (Andini, 2016).

### **3.6. Uji Daya Hambat *Extracellular Metabolites* (ECM) Isolat *Actinomycetes***

Isolat *Actinomycetes* yang terpilih dalam menghambat bakteri patogen MRSA paling tinggi pada skrining awal dengan menggunakan kultur sel kemudian dilakukan uji daya hambatnya menggunakan *Extracellular Metabolites* (ECM). Uji daya hambat menggunakan *Extracellular Metabolites* (ECM) dilakukan terhadap enam jenis bakteri patogen yang berbeda (*Escherichia coli*, *EPEC (Enteropathogenic Escherichia coli)*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan MRSA). Uji daya hambat ini menggunakan *Cell-free supernatant* dari *Actinomycetes* yang diperoleh dari kultur isolat *Actinomycetes* yang telah berada di fase stasionernya kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm, suhu 4 °C selama 15 menit. Pelet yang diperoleh dibuang, supernatan bebas sel digunakan untuk uji selanjutnya.

Supernatan disaring dengan membran filter *Minisart Syringe Filter Cellulose Acetate* 0,2 µm. Supernatan yang telah difilter, diatur pH hingga 7. Supernatan selanjutnya diinokulasikan sebanyak 20 µL ke dalam kertas cakram (Whatman no.1) dan ditunggu hingga kering. Suspensi bakteri patogen masing-masing dengan densitas 10<sup>7</sup> cfu/mL diinokulasikan sebanyak 0,1 mL dengan cara *dispread plate* pada Cawan Petri berisi media NA (*Nutrient Agar*) kemudian dидiamkan selama 1 jam dalam lemari es hingga kering. Kertas cakram diletakkan di atas permukaan Agar dan dидiamkan selama 30 menit dalam lemari es hingga kering. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam (Oskay, 2009; Andini, 2016). Diameter zona hambat (zona bening) yang terbentuk diukur dan dianggap positif bila zona hambatnya kurang lebih

berukuran 3 mm (Alharbi dkk., 2012; Evangelista & Martí'nez, 2013). Data yang diperoleh dianalisis ragam dengan  $\alpha \leq 0,05$ , hasil yang berbeda nyata dilakukan uji lanjutan. Data dianalisis dengan menggunakan *software* SPSS 17.0 for windows.

### **3.7. Identifikasi *Actinomyces* Berdasarkan Sekuen 16S rDNA**

#### **3.7.1. Isolasi DNA dan amplifikasi 16S rDNA**

Isolat *Actinomyces* yang memiliki potensi paling tinggi dalam menghambat bakteri pathogen MRSA, disubkultur dan diidentifikasi secara molekular menggunakan *i-genomic Soil DNA Extraction Mini Kit* dari *iNtRON Biotechnology, Inc.* Identifikasi molekular diawali dengan isolasi DNA, amplifikasi dengan PCR, dan sekuensing. Sebelum proses isolasi DNA, kultur isolate dibuat dalam Cawan Petri berisi media SCA kemudian ditumbuhkan selama kurang lebih tujuh hari pada suhu sekitar 28 °C. Koloni isolat yang telah tumbuh diambil sebanyak lima oose dan diinokulasikan ke dalam 50  $\mu$ L akuades steril. Sampel ditransfer ke dalam *Sample Grinder tube* lalu dipipeting. Sampel ditambahkan 400  $\mu$ L EG dan 80  $\mu$ L *inhibitor remover*. Sampel divorteks selama 10 menit. Setelah divorteks, sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama satu menit. Dua lapisan yang terbentuk dari hasil sentrifugasi adalah busa dan lapisan bening. Lapisan bening adalah supernatan yang diambil untuk proses selanjutnya.

Lapisan bening (supernatan) hasil sentrifugasi diambil sebanyak 300  $\mu$ L dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru. Setelah dipindahkan, pada supernatan ditambahkan 100  $\mu$ L EPT dan *dispin down* selama 5 detik. Sampel diinkubasi dalam es selama 10 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama tiga menit. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 300  $\mu$ L dan ditransfer ke dalam *microtube* baru. Sampel ditambahkan 300  $\mu$ L Buffer EB dan *diinvert* sebanyak enam kali tanpa di vorteks. Sampel ditambahkan EtOH 100 % sebanyak 300  $\mu$ L dan *diinvert* sebanyak enam kali tanpa di vorteks. Sampel dipindahkan ke *spin column*. Sampel ditambahkan 800  $\mu$ L *mixture* (Lysate) *dispin down* selama lima detik. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama satu menit.

Sampel yang terdapat pada *spin column* dipisahkan dan dibuang. Sampel dalam *microtube* ditambahkan dengan 100  $\mu$ L *mixture* (remnant) dan *dispin down* selama lima detik. Sampel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama satu menit. Sampel

yang terdapat pada *spin column* dipisahkan dan di letakkan pada *microtube* baru. Sampel kemudian ditambahkan dengan 700  $\mu$ L Buffer EWA dan disentrifugasi selama satu menit, 13.000 rpm. Setelah disentrifugasi, residu dibuang dan sampel ditambahkan 700  $\mu$ L Buffer EWB. Sampel disentrifugasi selama satu menit dalam kecepatan 13.000 rpm. Sampel yang terdapat dalam *spin column* dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan 50  $\mu$ L Buffer EE yang selanjutnya diinkubasi selama satu menit pada suhu ruang. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama satu menit. *Spin column* dipisahkan dan sampel DNA terdapat pada *microtube*.

Sampel DNA diverifikasi dan dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5 %. Gel agarosa 1,5 % dibuat dengan melarutkan 0,3 gram agarosa pada 20 mL TBE. Gel agarosa dipanaskan dalam *microwave* hingga larut dan mendidih (ditandai dengan larutan gel menjadi bening). Selanjutnya, ditambahkan 1  $\mu$ L EtBr (ethidium bromida) lalu diaduk dan dituang ke dalam cetakan yang telah diberi sisiran. Setelah cetakan gel padat, gel agarosa dipindahkan dalam *chamber* elektroforesis yang telah digenangi TBE. Marker DNA sebanyak 2  $\mu$ L, sampel DNA 3  $\mu$ L dan *loading dye* 2  $\mu$ L dimasukkan ke dalam sumuran sesuai peta *running*. Sampel kemudian *dirunning* dengan arus listrik 100 volt selama 30 menit. Setelah sampel *dirunning*, dilakukan visualisasi dengan UV transilluminator dan Gel Doc.

Sampel DNA diamplifikasi sekuen 16S rDNA menggunakan mesin PCR (*polymerase chain reaction*). Primer yang digunakan untuk amplifikasi adalah primer universal untuk target sekuen 16S rDNA yaitu primer 27f (-5'GCCTAACACATGCAAGTCGA-3') dan 1495r (3'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-5'). Sebanyak 25  $\mu$ L suspensi PCR *mix* untuk reaksi PCR dibuat dengan komposisi yang ditampilkan pada tabel 2. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin *Thermacycler* yang sudah diatur sesuai dengan program PCR. Program PCR diatur untuk 35 siklus dengan program dalam satu siklus disajikan pada tabel 3. Sekuen 16S rDNA yang telah teramplifikasi kemudian divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1 % dan menggunakan marker DNA dengan ukuran panjang 1000 bp. Gel agarosa berisi produk PCR kemudian divisualisasi menggunakan UV transilluminator dan gel Doc (Usha dkk., 2012).

Tabel 2. Komposisi PCR *mix* untuk amplifikasi 16S rDNA

No.	Larutan	Volume ( $\mu$ L)
1.	<i>Green go taq</i>	12,5 $\mu$ L
2.	Nuclease free water	9,5 $\mu$ L
3.	Primer <i>forward</i>	1 $\mu$ L
4.	Primer <i>reverse</i>	1 $\mu$ L
5.	DNA	1 $\mu$ L
	<b>Volume akhir</b>	25 $\mu$ L

Tabel 3. Reaksi PCR 16S rDNA

Tahapan	Suhu	Waktu (detik)	Siklus
Denaturasi awal	94 °C	180	1
<b>35 Siklus: Denaturasi</b>	94 °C	30	35
<b>Annealing</b>	56 °C	30	35
<b>Ekstensi</b>	72 °C	60	35
<b>Ekstensi akhir</b>	72 °C	420	1

(Nurkanto dkk., 2012)

### 3.7.2. Sekuensing 16S rDNA dan konstruksi pohon filogeni

Sekuen 16S rDNA dipurifikasi dan dikirimkan ke Laboratorium 1<sup>st</sup> BASE Pt. Genetika Science untuk menganalisis sekuen. Hasil sekuensing selanjutnya *diedit* menggunakan program *Bioedit*. Sekuen yang diperoleh *dialignment* menggunakan program *Clustal W* dan dibandingkan homologinya dengan sekuen spesies lain melalui *software* BLAST yang terintegrasi dengan *database* NCBI (GenBank) sehingga diperoleh spesies yang sesuai dengan sekuen isolat beserta tingkat similaritasnya. Setelah didapatkan hasil homologi sekuen 16S rDNA antara isolat dengan beberapa spesies lain, kemudian dikonstruksi pohon filogeni. Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan program MEGA 6.0 berdasarkan algoritma *neighbor-joining* untuk mengetahui jarak evolusi dan nilai similaritasnya. Konstruksi pohon filogeni ini menggunakan



analisis bootstrap 1000 (pengulangan sebanyak 1000 kali). Hasil pohon filogeni yang diperoleh diinterpretasikan (Isik dkk., 2014).