

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif.

#### **B. Populasi dan Sampel**

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah semua Isolat bakteri yang memiliki aktivitas antagonis terhadap jamur *Fusarium sp.* yang ditumbuhkan dalam medium PDA pada cawan Petri hasil penelitian Anisah (2008).
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri isolat B1 dan G1 (AFE-1 dan BLS-1) hasil penelitian Anisah (2008).

#### **C. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dimulai bulan Maret 2009 sampai dengan Mei 2009 yang dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

#### **D. Alat dan Bahan Penelitian**

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Alat-alat yang digunakan selama

penelitian ini terdapat pada Tabel 3.1, sedangkan daftar bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.2.

**Tabel 3.1** Alat – alat dan Bahan Penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Tabung mikrosentrifuga	75 Buah	-
2.	<i>Hot plate and Magnetic stirrer</i>	1 buah	Merk EYELA, RSCH - 3
3.	<i>High Performance UV Transilluminator</i>	1 buah	UVP Upland, CA.
4.	<i>Autoclave</i>	1 buah	Merk Hirayama Mode HC36At
5.	<i>Vorteks</i>	1 buah	Merk SIBATA
6.	<i>Waterbath shaker</i>	1 buah	UNI <i>Thermoshaker</i> NTS-1300
7.	Timbangan Analitik	1 buah	Merk AND, HF 300
8.	Batang pengaduk	2 buah	P = 29,5 cm
9.	<i>Transfer box</i>	1 buah	PT 25.221.03.019BM
10.	Spatula	2 buah	Logam
11.	Cawan Petri	30 buah	<i>Pyrex</i> ; $\phi = 9$ cm
12.	Lup inokulasi	1 buah	P = 22,5 cm; = 5 mm
13.	Tabung reaksi	50 buah	<i>Pyrex</i>
14.	Rak tabung	3 buah	-
15.	Gelas ukur 10 mL	1 buah	<i>Pyrex</i>
16.	Gelas ukur 50 mL	1 buah	<i>Pyrex</i>
17.	Gelas kimia 500 mL	1 buah	<i>Pyrex</i>
18.	Mikropipet	3 buah	Merk Gilson-PIPETMAN
19.	Lemari pendingin ( <i>Freezer</i> )	1 buah	PT25.221.03.021.BM
20.	Alat Elektroforesis gel Mini	1 buah	Bio-Rad <i>Mini Sub Cell</i> GT, CA USA
21.	Mesin PCR	1 buah	Perkin-Elmer 9700 <i>Applied Biosystem</i> , USA
22.	<i>Microcentrifuge</i>	1 buah	Merek <i>Eppendorf</i>

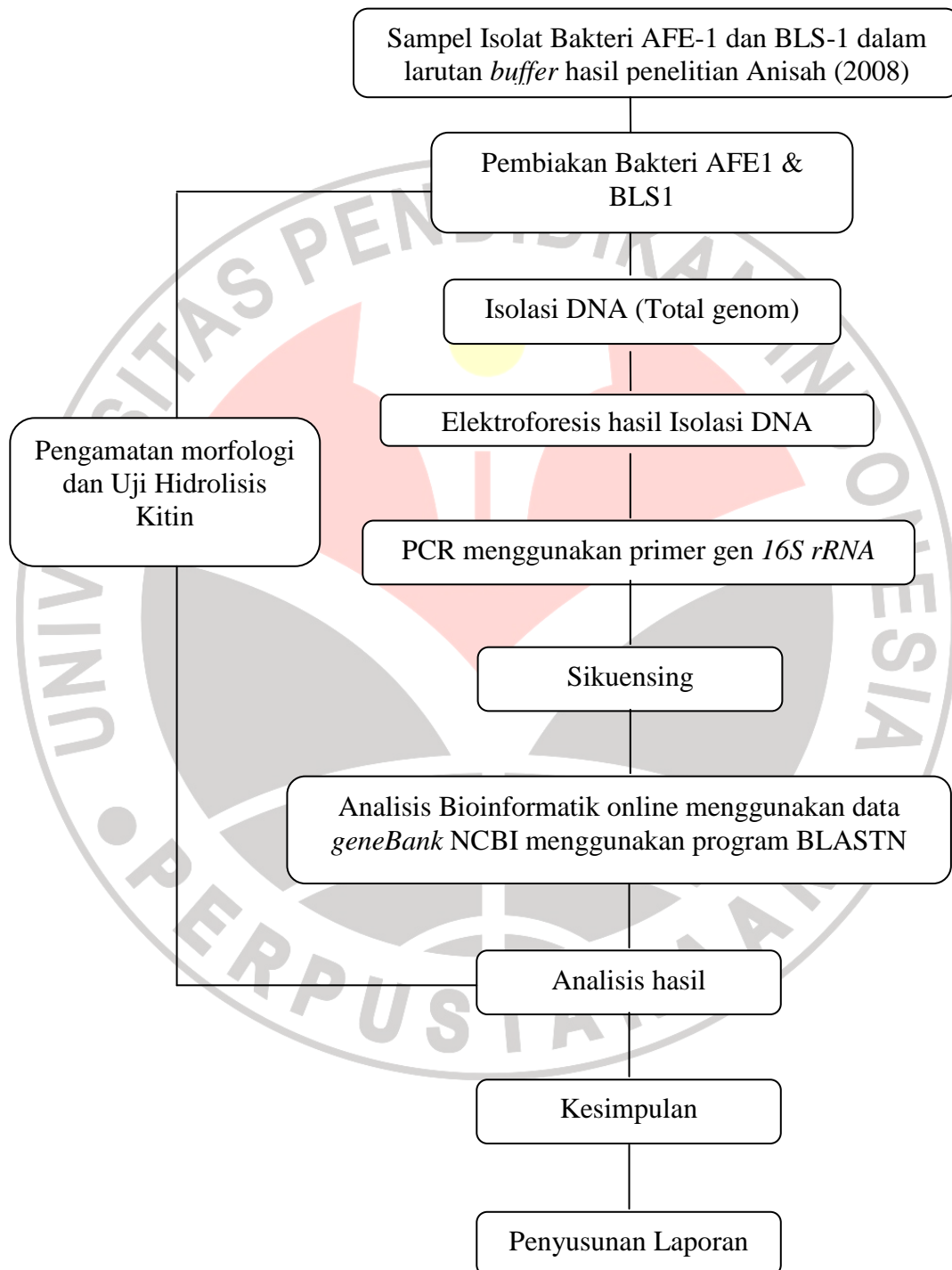
23.	<i>Automated DNA sequencer 2720 thermal cycler</i>	1 Buah	<i>Applied Biosystem, USA</i>
24.	Kamera Digital	1 Buah	Merek Samsung S-860
25.	Tips 100-1000 $\mu$ l, 20-200 $\mu$ l	200 Buah	-

**Tabel 3.2** Daftar Bahan-bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	Alkohol absolut (pa) dan 70%	1 liter
2.	ddH <sub>2</sub> O ( <i>Aqua bidestilata</i> )	5 liter
3.	NaCl pa	5 gram
4.	Kristal violet	3 ml
5.	Lugol	3 ml
6.	Safranin O	3 ml
7.	Gel Agarose (FERMENTAS)	5 gram
8.	Luria Bertani Agar	100 ml
9.	Koloidal Kitin	1 gram
10.	<i>Nutrien Agar (NA)</i>	10 gram
11.	Kultur bakteri Isolat B1 dan G1	@ 1 tabung
12.	<i>Taq Polymerase (NEB U.S.A)</i>	8 reaksi
13.	PCR <i>buffer</i> 10 x (NEB U.S.A)	8 reaksi
14.	dNTPs	8 reaksi
15.	<i>Forward primer 63F</i>	8 reaksi
16.	<i>Reverse primer 1387 R</i>	8 reaksi
17.	<i>Fermentas DNA Isolation KIT</i>	1 set
18.	Chloroform pa	30 ml
19.	TAE <i>Buffer</i> 50X	10 ml
20.	<i>1kbDNALadder NEB U.S.A</i>	20 $\mu$ l

### E. Alur dan Prosedur Kerja

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1** Alur Penelitian

Urutan penjelasan mengenai prosedur penelitian yang dilakukan sesuai dengan alur penelitian pada Gambar 3.1 adalah sebagai berikut :

## 1. Persiapan Penelitian

### a. Sterilisasi Alat

Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 15 lb.

### b. Pemiakan Isolat Bakteri

Satu *loop* inokulasi penuh berisi isolat bakteri AFE-1 dan BLS-1 dalam larutan *buffer* (cryoreservasi)  $-20^{\circ}\text{C}$  diambil, kemudian diinokulasikan pada medium NA (*nutrien agar*). Bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama kurang dari 1x 24 jam, koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya siap untuk di sub kultur ke dalam medium cair. Untuk pemiakan bakteri pada medium cair, diambil satu sampai dua koloni tunggal sel bakteri isolat AFE-1 dan BLS-1 dengan *loop* inokulasi, kemudian koloni yang terambil diinokulasikan ke dalam 25 ml medium NB (*nutrien broth*) dalam tabung Erlenmeyer 50 ml. Selanjutnya tabung diinkubasi selama 16 – 18 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan selama inkubasi kultur diagitasi pada kecepatan 150-175 rpm dalam *waterbath shaker*. Setelah 16-18 jam dilihat pertumbuhan sel bakteri dalam kultur. Perubahan medium menjadi keruh menandakan bakteri tumbuh dengan baik dan siap untuk diisolasi DNA.

## 2. Tahap Penelitian

### a. Pengamatan Morfologi dan Uji Hidrolitik Kitin Bakteri AFE-1 dan BLS-1

Pengamatan morfologi dilakukan untuk memastikan bentuk sel bakteri AFE-1 dan BLS-1 dilakukan melalui pewarnaan Gram. Untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim degradatif kitinase sebagai salah satu mekanisme antagonisme bakteri untuk menghambat perumbuhan *Fusarium sp.* dilakukan melalui uji aktivitas hidrolitik kitin (kitinolitik). Untuk uji aktivitas kitinolitik, kedua isolat diinokulasikan ke dalam medium Luria-Bertani agar yang ditambah 1% koloidal kitin (Modifikasi El-Hamshary and Khattab, 2008:27). Reaksi positif kitinolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

### b. Isolasi DNA total (genom)

DNA total isolat bakteri AFE-1 dan BLS-1 diisolasi menggunakan KIT (FERMENTAS, Lithuania) dengan beberapa modifikasi pada beberapa langkah proses isolasi. Bakteri diperoleh dari kultur bakteri pada medium *nutrien broth* sebelumnya yang berumur kurang dari 24 jam. Sebanyak 1,5 ml kultur cair bakteri masing-masing isolat dipindahkan dalam tabung sentrifuga 2.0 ml steril. Sampel tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 4 menit. Supernatan berisi medium cair dibuang dan jangan sampai ada sisa medium dalam tabung. Endapan sel bakteri kemudian ditambahkan dengan 200  $\mu$ L larutan NaCL 0.85% kemudian resuspensi dengan cara dibolak-balik

sebanyak 50 kali. Selanjutnya, ke dalam tabung sentrifuge kemudian ditambahkan 400  $\mu\text{L}$  larutan lisis (*lysis solution*). Tabung kemudian diinkubasi dalam waterbath shaker pada suhu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Setelah inkubasi selesai, selanjutnya ke dalam tabung ditambahkan 400  $\mu\text{L}$  chloroform, larutan kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik 3-5 kali dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Selama sentrifugasi, disiapkan larutan presipitasi dengan cara melarutkan 80  $\mu\text{L}$  larutan *precipitation solution* dengan 720  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O steril. Setelah sentrifugasi, supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan dipindahkan pada tabung sentrifuga yang baru, kemudian ditambahkan 800  $\mu\text{L}$  larutan presipitasi lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1-2 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang secara hati-hati. Setelah itu ke dalam tabung ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  NaCl *solution* (1.2 M) pastikan pelet DNA larut, lalu ditambahkan 300  $\mu\text{L}$  etanol absolut (alkohol 96%) dingin, sampel kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit., sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang secara hati-hati sampai terlihat pelet DNA. Selanjutnya pelet DNA dicuci dengan menambahkan alkohol 70% dingin, sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu, supernatan alkohol pada lapisan atas dibuang secara hati-hati sampai habis. Tutup tabung sentrifuga dibiarkan terbuka sampai alkohol menguap dan pelet DNA mengering. Pelet DNA kemudian dilarutkan dalam 20  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O steril dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk digunakan pada proses amplifikasi.

### c. Amplifikasi DNA (PCR)

Amplifikasi gen *16S rRNA* pada penelitian ini mengacu pada proses amplifikasi yang dilakukan oleh Marchesi *et al.* (1998). Komposisi *mix* PCR untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA : *buffer* enzim (NEB U.S.A) 10x sebanyak 2,5  $\mu$ l hingga konsentrasi akhir 2,5 mM, dNTPs (*mix*) sebanyak 0,5  $\mu$ l dengan konsentrasi akhir 0,2 mM tiap dNTP, Enzim *Taq polimerase* (NEB U.S.A) dengan konsentrasi akhir 1-2,5 U/ $\mu$ l, primer 63F (5'CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387R (5'-GGG GGG A/TGT GTA CAA GGC-3') dengan konsentrasi akhir 0,4  $\mu$ M masing-masing 1,0  $\mu$ l. Sebanyak 1,0  $\mu$ l DNA bakteri (total genom) sebagai DNA *template* dan menambahkan *Aqua bidestilata* (ddH<sub>2</sub>O) steril hingga volume 25  $\mu$ l.

Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Perkin Elmer thermal cycler*) yang diprogram untuk melaksanakan beberapa kondisi (Modifikasi Marchesi *et al.*,1998), yaitu pre denaturasi awal pada suhu 95° C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94° C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55° C selama 30 detik, *extension* pada suhu 72° C selama 30 detik, tahap *extension* Akhir pada suhu 72° C selama 10 menit dan tahap inkubasi pada suhu 4 ° C tanpa batas waktu. Reaksi amplifikasi pada mesin PCR dilakukan selama 30 siklus. Amplikon dielektroforesis pada gel agarose 0,8% dalam buffer TAE 1X untuk melihat kualitas hasil amplifikasi.



#### d. Elektroforesis DNA

Langkah awal elektroforesis yaitu menyiapkan *tray*/cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Sisi cetakan yang terbuka dikunci dengan menggunakan slot khusus yang telah disediakan. Sebelumnya telah dipastikan posisi cetakan berada pada bidang datar dengan menggunakan waterpass. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 0,8% dalam *buffer* TAE 1X. Gel agarose dididihkan dengan *hotplate* atau *microwave* sampai agar larut dan berwarna bening. Gel agarose yang sudah hangat-hangat kuku dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) tempat aplikasi sampel. Sisir dipasang dengan posisi tegak dan berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Selanjutnya gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang.

Gel dan cetakannya kemudian direndam pada *buffer* TAE 1X pada kolom elektroforesis. Larutan sampel (DNA atau amplicon hasil PCR) dari *freezer* diambil sebanyak 5-8  $\mu\text{L}$  kemudian dicampurkan dengan 2  $\mu\text{L}$  *loading dye*. Sampel dimasukan ke dalam sumur yang terdapat dalam gel pada kolom elektroforesis. Setelah sampel dimasukkan, sampel kemudian dielektroforesis pada tegangan 75 volt selama 45 menit. Gel berisi DNA hasil elektroforesis diwarnai dengan larutan *Etidium Bromide* (EtBr) selama lima menit, kemudian dibilas dengan aquadest untuk membuang kelebihan EtBr. Gel hasil elektroforesis diamati dengan sinar UV (*UV transilluminator*), fragmen DNA yang muncul didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.

#### e. Sikuensing DNA

Proses sikuensing dilakukan dengan mesin *sequencer*, karena keterbatasan fasilitas di laboratorium proses sikuensing dilakukan di Laboratorium *Research and Development* PT. CHAROEN POKPHAND INDONESIA (Jakarta). Sikuensing gen *16S rRNA* dilakukan dari dua arah, masing-masing arah *forward* menggunakan primer 63F dan dari arah *reverse* menggunakan primer 1387R. Sikuen yang terbaca oleh mesin sikuenser selanjutnya dianalisis contig menggunakan program BioEdit untuk memperoleh sikuen parsial gen *16S rRNA* yang utuh.

#### f. Analisis Data

Identifikasi isolat AFE-1 dan BLS-1 sampai tingkat taksa spesies atau sub spesies dilakukan melalui analisis sikuen gen *16S rRNA* menggunakan metode bioinformatika secara *online*. Hasil sikuensing dikomparasikan dengan data gen *16S rRNA* yang ada pada *database* Bank Gen NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) di alamat website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>. Hal ini bertujuan untuk melihat homologi dan komparasi sikuen parsial gen *16S rRNA* isolat bakteri AFE-1 dan BLS-1 (sikuen subjek) dengan *database* (sikuen *query*) yang ada secara *online* menggunakan program pencari sikuen BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*). Hasil analisis bioinformatika berupa grafik penyejajaran sikuen dan urutan spesies mulai dari species yang paling dekat kedekatan genetiknya dengan sikuen gen *16S rRNA* subjek (Isolat AFE-1 dan BLS-1). Identitas kemiripan spesies dilihat dari nilai persentase identitas

kemiripan (*Maximum Identity*), skor penyejajaran sikuen (*Maximum Score*), dan nilai kemungkinan ketidakmiripan (*E value*). Selain itu, dibuat juga pohon filogenetik berbasis sikuen gen *16S rRNA* menggunakan program CLUSTALX 2.0.10. Hal ini bertujuan untuk menunjukkan sejauh mana kekerabatan antara bakteri AFE-1 dan BLS-1 dengan bakteri lainnya pada genus yang sama. Sikuen gen *16S rRNA* diambil dari *database* yang ada pada situs GeneBank EMBL (*European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence*) di alamat [http://www.ebi.ac.uk/ebi\\_docs/embl\\_db.html](http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db.html).

