

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 filofit *Ageratum conyzoides* L.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri pada daun *A. conyzoides* L. 1,3 dan 5 .

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan Maret 2010 sampai dengan Juni 2010 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 dan bahan yang digunakan selama penelitian ini terdapat **Tabel 3.1** dan **Tabel 3.2**

Tabel 3.1 Daftar alat – alat Penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Tabung mikrosentrifuga	-	75 buah
2.	Hot plate and Magnetic stirrer	Merk EYELA, RSCH - 3	1 buah
3.	High Performance UV Transilluminator	UVP Upland, CA.	1 buah
4.	Autoclave	Merk Hirayama Mode HC36At	1 buah
5.	Vorteks	Merk SIBATA	1 buah
6.	Waterbath shaker	UNI Thermoshaker NTS-1300	1 buah
7.	Timbangan Analitik	Merk AND, HF 300	1 buah
8.	Batang pengaduk	P = 29,5 cm	2 buah
9.	Transfer box	PT 25.221.03.019BM	1 buah
10.	Spatula	Logam	2 buah
11.	Cawan Petri	Pyrex; diameter = 9 cm	30 buah
12.	Lup inokulasi	P = 22,5 cm; = 5 mm	1 buah
13.	Tabung reaksi	Pyrex	50 buah
14.	Rak tabung	-	3 buah
15.	Gelas ukur 10 mL	Pyrex	1 buah
16.	Gelas ukur 50 mL	Pyrex	1 buah
17.	Gelas ukur 500 mL	Pyrex	1 buah
18.	Mikropipet	Merk Gilson-PIPETMAN	3 buah
19.	Lemari pendingin (Freezer)	PT25.221.03.021.BM	1 buah
20.	Alat Elektroforesis gel Mini	Bio-Rad Mini Sub Cell GT, CA USA	1 buah
21.	Mesin PCR	Perkin-Elmer 9700 Applied Biosystem, USA	1 buah
22.	Microcentrifuge	Merek Eppendorf	1 buah
23.	Automated DNA sequencer 2720 thermal cycler	Applied Biosystem, USA	1 buah
24.	Kamera Digital	Kodak	1 buah
25.	Tips 100-1000 µl, 20-200 µl	-	200 buah
26.	Colony counter	SIBATA	1 buah
27.	Jangka sorong	Caliper	1 buah

Tabel 3.2 Daftar Bahan-bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	Daun <i>Ageratum conyzoides</i> L.	10 gram
2.	Alkohol absolut (pa) dan 70%	1 liter
3.	ddH ₂ O (Aqua bidestilata)	5 liter

No.	Nama Bahan	Jumlah
4.	NaCl pa	5 gram
5.	Kristal violet	3 ml
6.	Lugol	3 ml
7.	Safranin O	3 ml
8.	Gel Agarose (FERMENTAS)	5 gram
9.	Luria Bertani Agar	100 ml
10.	Susu skim	10 gram
11.	Nutrien Agar (NA)	10 gram
12.	Kultur bakteri Isolat A dan B	@ 1 tabung
13.	Taq Polymerase (NEB U.S.A)	8 reaksi
14.	PCR buffer 10 x (NEB U.S.A)	8 reaksi
15.	dNTPs	8 reaksi
16.	Forward primer 63F	8 reaksi
17.	Reverse primer 1387 R	8 reaksi
18.	Fermentas DNA Isolation KIT	1 set
19.	Chloroform pa	30 ml
20.	TAE Buffer 50X	10 ml
21.	1kbDNALadder NEB U.S.A	20 μ l

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Penelitian

Pembuatan medium sebagai media tumbuh bakteri filosoffer. Medium tumbuh yang digunakan adalah medium LB (*Luria Bertani*). 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 menit pada suhu 121⁰ C dan tekanan 15 lb.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun *Ageratum conyzoides* L. dilakukan di Kebun Botani FPMIPA UPI Bandung. Pencuplikan daun menggunakan peralatan steril yang telah dilakukan sterilisasi panas lembab dengan *autoclave* dan disemprot dengan alkohol 70%. Sampel daun yang diambil yaitu daun ke-1, ke-3 dan ke-5.

b. Isolasi Bakteri Filosfer

Daun hasil pencuplikan dimasukkan ke dalam tabung cuvet sebanyak 3-4 helai daun (± 1 gram daun) lalu ditambahkan NaCl dan ddH₂O sebanyak 10 ml, divorteks selama 15 menit. Pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-6} untuk masing-masing daun (Lindow & Brandl, 2003). Hasil pengenceran dimasukan ke dalam cawan Petri sebanyak 1.0 ml dan ditambahkan medium *Luria Bertani* kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

c. Pengamatan Morfologi

Setelah 24 jam inkubasi dilakukan pengamatan jumlah dan karakteristik koloni sampai 10x24 jam. Morfologi bakteri yang diamati di antaranya bentuk, warna (pigmentasi), tepian, kenampakan koloni (mengkilat atau suram), dan elevasi (Cappuccino & Sherman, 1987). Pengamatan jumlah dilakukan dengan menggunakan *colony counter*.

d. Pewarnaan Gram

Hasil isolasi bakteri tersebut dilakukan kultur murni untuk sejumlah bakteri yang memiliki perbedaan morfologi. Setelah isolat berumur 1x24 jam bakteri tersebut dilakukan pewarnaan Gram dan KOH *string test* (Cappuccino & Sherman, 1987; Arthi *et al.*, 2003). Tahap pertama pewarnaan Gram yaitu pembuatan sediaan mikroskopik dengan cara mengambil biakan murni yang akan diwarnai. Kemudian sediaan tersebut dituangi dengan karbol kristal violet dan biarkan selama tiga menit. Selanjutnya kelebihan warna pada sediaan tersebut dibuang. Lalu diberi larutan lugol dan biarkan selama 45-60 detik. Sediaan tersebut dimasukkan ke dalam alkohol 96% dalam beker gelas dan goyang-goyangkan selama satu menit. Tahap selanjutnya yaitu membilas sediaan tersebut dengan air dan keringkan dengan kertas isap. Setelah itu dituangi dengan larutan safranin O biarkan selama tiga menit. Untuk kelebihan warna dapat dicuci dengan air lalu keringkan di udara. Setelah sediaan kering amati sediaan tersebut di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif 100x yang terlebih dahulu sediaan mikroskopik telah ditetesi minyak imersi. Hasil pewarnaan dapat diketahui dengan indikator warna merah untuk bakteri Gram negatif dan warna ungu untuk bakteri Gram positif (Cappuccino, 1987). Untuk penentuan sifat Gram dengan KOH *string test* dapat dilakukan dengan cara satu *loop* inokulasi dicampurkan dengan KOH 4% yang telah ditetaskan pada kaca objek, kemudian diamati perubahan yang terjadi.

Bakteri Gram negatif ditunjukkan dengan campuran KOH dan suspensi bakteri yang berubah menjadi lengket (Arthi *et al.*, 2003).

e. Uji Hidrolisis Protein

Bakteri yang telah dilakukan kultur murni setelah 48 jam, dilakukan uji proteolitik untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim degradatif protein. Bakteri ditumbuhkan pada medium *Luria Bertani* yang telah ditambahkan 1% susu skim (Dajanta *et al.*, 2009). Setiap isolat bakteri ditumbuhkan dengan diameter ± 2.5 mm. Reaksi positif proteolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Cappuccino, 1987).

f. Cryoreservasi

Bakteri yang positif uji proteolitik dimasukkan ke dalam *Cryo Buffer* dalam tabung sentrifuga kemudian disimpan dalam *freezer* (-20°C). Hal ini dilakukan agar bakteri dapat disimpan dalam waktu yang lama.

g. Pembiakan Isolat Bakteri

Satu *loop* inokulasi penuh berisi isolat bakteri pendegradasi protein paling tinggi dalam larutan *buffer* (cryoreservasi) -20°C diambil, kemudian diinokulasikan pada medium LB agar. Bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya siap untuk disubkultur ke dalam medium LB cair. Untuk pembiakan bakteri pada medium

cair, diambil satu sampai dua koloni tunggal sel bakteri isolat dengan *loop* inokulasi, kemudian koloni yang terambil diinokulasikan ke dalam 25 ml medium LB cair dalam tabung Erlenmeyer 50 ml. Selanjutnya tabung diinkubasi selama 16 jam pada suhu 25°C dan selama inkubasi kultur diagitasi pada kecepatan 150-175 rpm dalam *shaker*. Setelah 16 jam dilihat pertumbuhan sel bakteri dalam kultur. Pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari perubahan medium menjadi keruh dan selanjutnya kultur bakteri siap untuk diisolasi DNA.

h. Isolasi DNA total (genom)

DNA total isolat bakteri pendegradasi protein paling tinggi diisolasi menggunakan KIT (FERMENTAS, Lithuania) dengan beberapa modifikasi pada beberapa langkah proses isolasi. Bakteri diperoleh dari kultur bakteri pada medium LB cair sebelumnya yang berumur ±16 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 yang terbentuk kemudian dibuang dan jangan sampai ada sisa medium dalam tabung yang menyisakan endapan sel bakteri. Endapan sel bakteri kemudian ditambahkan dengan 200 µL larutan NaCL 0.85% kemudian resuspensi dengan cara dibolak-balik 30-50 kali. Selanjutnya, ditambahkan 400 µL larutan lisis (*lysis solution*) ke dalam tabung sentrifuga. Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 65°C selama 10 menit. Setelah tahap inkubasi

selesai, selanjutnya ditambahkan 400 μL chloroform ke dalam tabung, larutan kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik 3-5 kali dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama dua menit. Selama sentrifugasi, disiapkan larutan presipitasi dengan cara melarutkan 80 μL larutan *precipitation solution* dengan 720 μL ddH₂O steril. Setelah sentrifugasi, supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan dipindahkan pada tabung sentrifuga yang baru, kemudian ditambahkan 800 μL 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 μL NaCl *solution* (1.2 M) pastikan pelet DNA larut, lalu ditambahkan 300 μL etanol absolut (alkohol 96%) dingin, sampel kemudian disimpan pada suhu -20°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 μL ddH₂O steril dan disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan pada proses amplifikasi.

i. 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 µl hingga konsentrasi akhir 2,5 mM, dNTPs (*mix*) sebanyak 0,5 µl dengan konsentrasi akhir 0,2 mM tiap dNTP, Enzim *Taq polimerase* (NEB U.S.A) dengan konsentrasi akhir 1-2,5 U/µl, primer 63F dan 1387R dengan konsentrasi akhir 0,4 µM masing-masing 1,0 µl. Sebanyak 1,0 µl DNA bakteri (total genom) sebagai DNA *template* dan menambahkan *Aqua bidestilata* (ddH₂O) steril hingga volume 25 µl. 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.

j. Elektroforesis DNA

Tahap awal elektroforesis adalah menyiapkan cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 0,8%

dalam *buffer* TAE 1X. Gel agarosa dididihkan dengan *hotplate* atau *microwave* sampai agar larut dan berwarna bening. Gel agarosa yang sudah hangat-hangat kuku dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) tempat aplikasi sampel dan dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel dan cetakannya kemudian direndam pada *buffer* TAE 1X pada kolom elektroforesis. Larutan sampel (DNA atau amplicon hasil PCR) diambil sebanyak 3-5 μL kemudian dicampurkan dengan 2 μL *loading dye*. Sampel dimasukkan 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 selama tiga menit. Gel hasil elektroforesis diamati dengan sinar UV (*UV transilluminator*), fragmen DNA yang muncul didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.

k. Sikuensing DNA

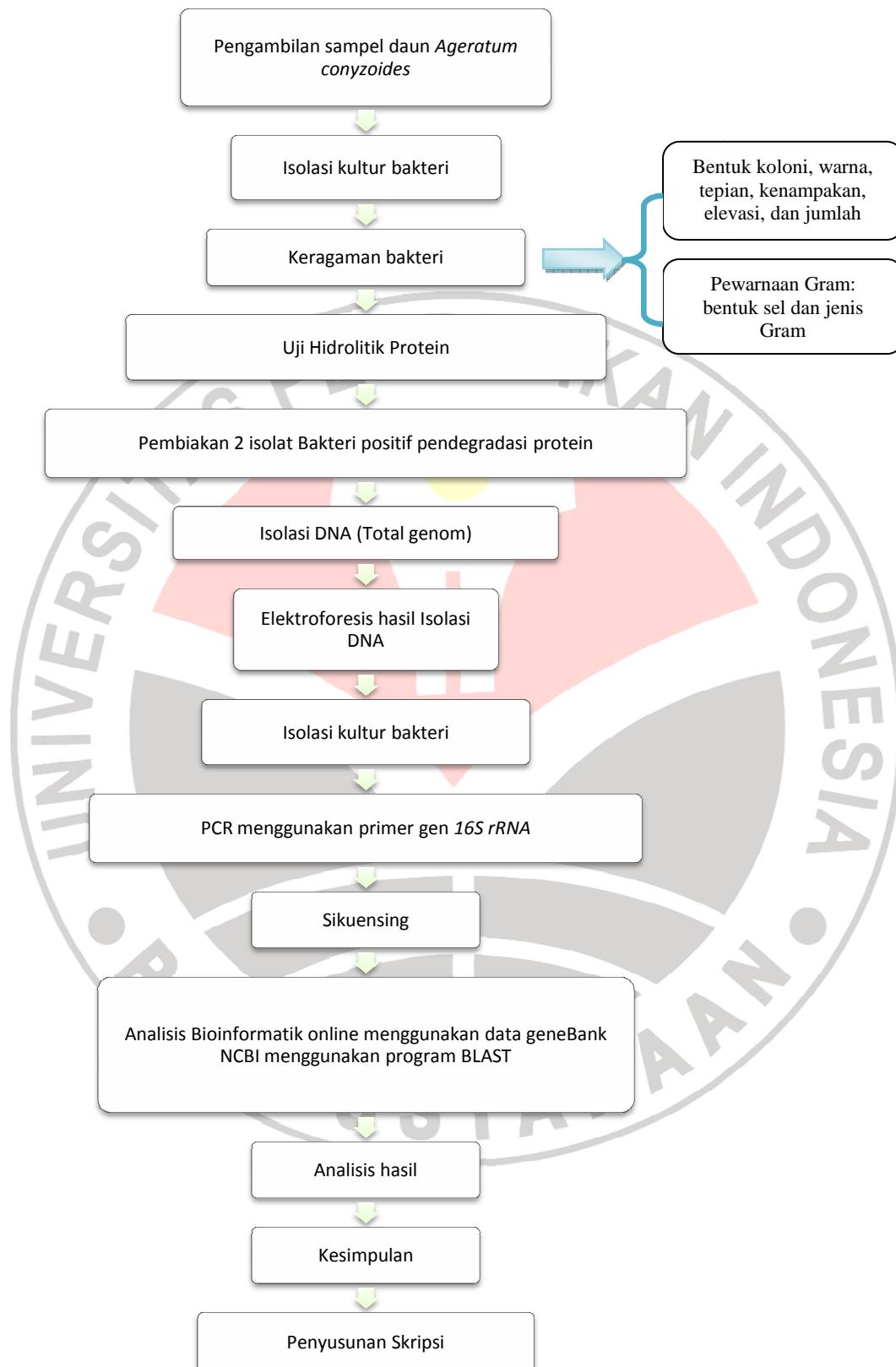
Proses sikuensing dilakukan dengan mesin *sequencer*, karena keterbatasan fasilitas di laboratorium proses sikuensing dilakukan di instansi lain. Sikuensing gen *16S rRNA* dilakukan dari satu arah yaitu dari arah *forward* menggunakan primer 63F.

F. Analisis Data

Identifikasi isolat pendegradasi protein paling tinggi sampai tingkat taksa spesies atau sub spesies dilakukan melalui analisis sikuen gen *16S rRNA* menggunakan metode bioinformatika secara *online*. Hasil sikuensing dibandingkan 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 pendegradasi protein paling tinggi (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 pendegradasi protein paling tinggi).

A. Alur Penelitian

Urutan penjelasan mengenai prosedur penelitian yang dilakukan sesuai dengan alur penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian