

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 filosfer *Ageratum conyzoides* L.
2. Sampel yang digunakan untuk diamati adalah Isolat bakteri filosfer *A. conyzoides* L daun 1, 3 dan 5.
3. Sampel yang digunakan untuk amplifikasi dalam penelitian ini adalah 2 isolat bakteri terpilih yang mempunyai aktivitas pendegradasi kitin tertinggi (dari hasil uji aktivitas kitinolitik).

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan Maret 2010 sampai bulan juni 2010 yang dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

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.

Tabel 3.1 Alat – alat dan bahan penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Mikroskop binokuler	1 buah	Merk Shimadzu S12 – D180 F
2.	Hot plate and Magnetic stirrer	1 buah	Merk EYELA, RSCH - 3
3.	High Performance UV Transilluminator	1 buah	UVP Upland, CA.
4.	Autoclave	1 buah	Merk Hirayama Mode HC36At
5.	Vorteks	1 buah	Merk SIBATA
6.	Waterbath shaker	1 buah	UNI Thermoshaker NTS-1300
7.	Timbangan Analitik	1 buah	Merk AND, HF 300
8.	Spectrophotometer	1 buah	Milton Roy Spectronic 20D
9.	Transfer box	1 buah	PT 25.221.03.019BM
10.	Jangka Sorong	1 buah	Milimeter (mm)
11.	Cawan Petri	30 buah	Pyrex; $\phi = 9$ cm
12.	Lup inokulasi	2 buah	P = 22,5 cm; $\phi = 5$ mm
13.	Tabung reaksi	50 buah	Pyrex
14.	Rak tabung	3 buah	-
15.	Gelas ukur 10 mL	1 buah	Pyrex
16.	Gelas ukur 50 mL	1 buah	Pyrex
17.	Gelas kimia 500 mL	1 buah	Pyrex
18.	Makropipet	3 buah	Merk PIPETMAN
19.	Lemari pendingin	1 buah	PT25.221.03.021.BM
20.	Batang pengaduk	2 buah	P = 29,5 cm
21.	Spatula	2 buah	Logam
22.	Pelubang gabus	1 buah	$\phi = 6$ mm
23.	Alat Elektroforesis gel Mini	1 buah	Bio-Rad Mini Sub Cell GT, CA USA
24.	Mesin PCR	1 buah	Applied Biosystem, USA
25.	Microcentrifuge	1 buah	Merek Eppendorf
26.	Automated DNA sequencer 2720 thermal cycler	1 Buah	Applied Biosystem, USA

Tabel 3.1 Alat – alat dan bahan penelitian (Lanjutan)

27.	Spin	1 Buah	Merek MiniSpin
28.	Kamera Digital	1 Buah	Merek Kodak
29.	Tabung Eppendorf	25 Buah	-
30.	Tips	200Buah	-
31.	Alkohol absolut (pa) dan 70%	1 liter	-
32.	ddH ₂ O (<i>Aqua bidestilata</i>)	5 liter	-
33.	NaCl pa	5 gram	-
34.	Kristal violet	3 ml	-
35.	Lugol	3 ml	-
36.	Safranin O	3 ml	-
37.	Gel Agarose (FERMENTAS)	5 gram	-
38.	Luria Bertani Agar	300 ml	-
39.	Koloidal Kitin	1 gram	-
40.	Nutrien Agar (NA)	10 gram	-
41.	Kultur bakteri Isolat		-
42.	Taq Polymerase (NEB U.S.A)	8 reaksi	-
43.	PCR buffer 10 x (NEB U.S.A)	8 reaksi	-
44.	dNTPs	8 reaksi	-
45.	Forward primer 63F	8 reaksi	-
47.	Reverse primer 1387 R	8 reaksi	-
48.	Fermentas DNA Isolation KIT	1 set	-
49.	Chloroform pa	30 ml	-
50.	TAE Buffer	50X 10 ml	-
51.	20 1kbDNALadder NEB U.S.A	20 µl	NEB U.S.A

E. Langkah Kerja

1) Sterilisasi Alat dan Medium

Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan dengan kertas *tissue*. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121⁰ C dan tekanan 15 lb. Medium juga disterilkan selama 10-15 menit.

2) Pengambilan sampel

Pengambilan sampel filosfer *Ageratum conyzoides* L dilakukan di Kebun Botani FPMIPA UPI Bandung. Pencuplikan filosfer menggunakan peralatan steril.

3) Isolasi Bakteri Asal Filosfer

Daun hasil pencuplikan ditambah NaCl 0.85% (Pepper and Gerba, 2004) dan ddH₂O, divorteks, dan dilakukan pengenceran dari 10⁻¹ sampai 10⁻⁶. Hasil pengenceran dimasukan kedalam medium LB (Kamil *et al.* 2007) kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

4) Pengamatan Morfologi

Setiap 24 jam dilakukan pengamatan yang merujuk kepada Cappuccino (1987), ciri morfologi bakteri yang perlu diperhatikan dari mulai bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian.. Hal ini dilakukan selama 10 hari. Pada hari ke sepuluh dilakukan subkultur (kultur murni) dari koloni yang ada. Dilakukan pula penghitungan jumlah koloni.

5) Uji Kitinolitik

Setelah mendapatkan kultur murni yang berumur 24 jam, dilakukan uji kitinolitik pada medium LB dengan penambahan 1% koloidal kitin (El-Hamshary and Khattab, 2008; Kamil *et al.* 2007). Kemudian dilakukan pewarnaan Gram.

6) Pewarnaan Gram

Hasil isolasi bakteri tersebut dilakukan kultur murni untuk sejumlah bakteri terpilih yang memiliki perbedaan morfologi. Setelah berumur 1x24 jam

bakteri tersebut dilakukan pewarnaan Gram. Dibuat sediaan mikroskopik dari biakan yang akan diwarnai, kemudian sediaan dituangi dengan karbol Kristal violet. Setelah dibiarkan selama tiga menit, kelebihan zat warna dibuang dan dituangi lugol, biarkan selama 45-60 detik. Selanjutnya sediaan dimasukan ke dalam beker gelas berisi alkohol 96%, goyang-goyangkan selama 1 menit, bilas dengan air dan keringkan dengan kertas isap. Setelah sediaan kering tuangi dengan Safranin, biarkan selama 3 menit, cuci dengan air menggunakan botol semprot dan keringkan di udara. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif 100 X, yang telah diberi minyak imersi. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika sel bakteri berjenis Gram positif dan berwarna merah jika sebaliknya.

7) Cryoreservasi

Bakteri yang positif Uji kitinolitik dimasukan ke dalam *Crayo Buffer*. Satu *loop* inokulasi penuh berisi isolat bakteri, dimasukan ke dalam tabung sentrifuga 2.0 ml steril, kemudian disimpan pada suhu -20°C .

8) Pembiakan Isolat Bakteri

Satu *loop* inokulasi penuh berisi isolat bakteri 1.8 dan 1.14 dalam larutan *buffer (cryoreservasi)* -20°C diambil, kemudian diinokulasikan pada medium LB (*Luria bertani 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 pembiakan bakteri pada medium cair, diambil satu sampai dua koloni tunggal sel bakteri isolat 1.8 dan 1.14 dengan *loop* inokulasi, kemudian koloni yang diambil diinokulasikan ke dalam 25 ml medium LB

(*Luria bertani*) dalam tabung Erlenmeyer 50 ml. Selanjutnya tabung diinkubasi selama 16 – 18 jam pada suhu ruang dan selama inkubasi kultur diagitasi pada kecepatan 150-175 rpm dalam *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.

9) Isolasi DNA Total Isolat Bakteri Pendegradasi Kitin Tertinggi

Isolasi DNA total isolat bakteri dilakukan dengan 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 μ L larutan NaCL 0.85% kemudian resuspensi dengan cara dibolak-balik 30-50 kali. Selanjutnya, ditambahkan 400 μ L larutan lisis (*lysis solution*) ke dalam tabung sentrifuga. Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 65°C selama 25 menit. Setelah tahap inkubasi selesai, selanjutnya ditambahkan 400 μ L chloroform ke dalam tabung, 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 μ L larutan *precipitation solution* dengan 720 μ L 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 24 jam, 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.

10) Elektroforesis DNA hasil isolasi

Larutan DNA dari *freezer* diikubasi pada ruang selama 5 menit, lalu sebanyak 3 μL sampel DNA dicampurkan dengan 2 μL *loading buffer*. Sampel DNA dimasukan dalam sumur pada gel agarose 0,8-1 % dalam *buffer* TAE 1x (Buffer TAE 50x diencerkan dengan *aqua bidestilata* (ddH₂O) dengan perbandingan 1:49 v/v). Dimasukan juga pada sumur terpisah DNA *marker* sebanyak 1,5 μL , *marker* yang digunakan pada elektroforesis ini adalah *Ikbladder* (NEB USA). Selanjutnya DNA dielektroforesis selama 30-45 menit pada tegangan 75 volt. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan

dengan cara merendam gel agarose pada larutan ethidium bromide (10 µg/ml) selama 5 menit, dilanjutkan dengan perendaman pada ddH₂O selama 2 menit. Selanjutnya gel hasil elektroforesis diamati dengan sinar UV (UV *transluminator*). Sisa larutan sampel DNA dilabeli dan disimpan pada suhu - 20° C. Jika terdapat *band* (larik) DNA yang muncul maka *band* (larik) yang muncul didokumentasikan menggunakan kamera digital dan sampel siap untuk di amplifikasi dengan metode PCR.

11) PCR menggunakan Primer untuk gen *16S rRNA*

Proses amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR menggunakan primer untuk amplifikasi 16S rDNA, yaitu 63F dan 1387R (Marchesi, 1998:795 dan Gonzalez, 2005:190). Amplifikasi dilakukan selama 30 siklus pada alat *thermocycler* (mesin PCR).

12) Elektroforesis DNA Hasil PCR

Untuk melihat fragmen DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR, selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel Agarose konsentrasi 0,8%-1% dengan prosedur sama dengan proses Elektroforesis DNA hasil isolasi.

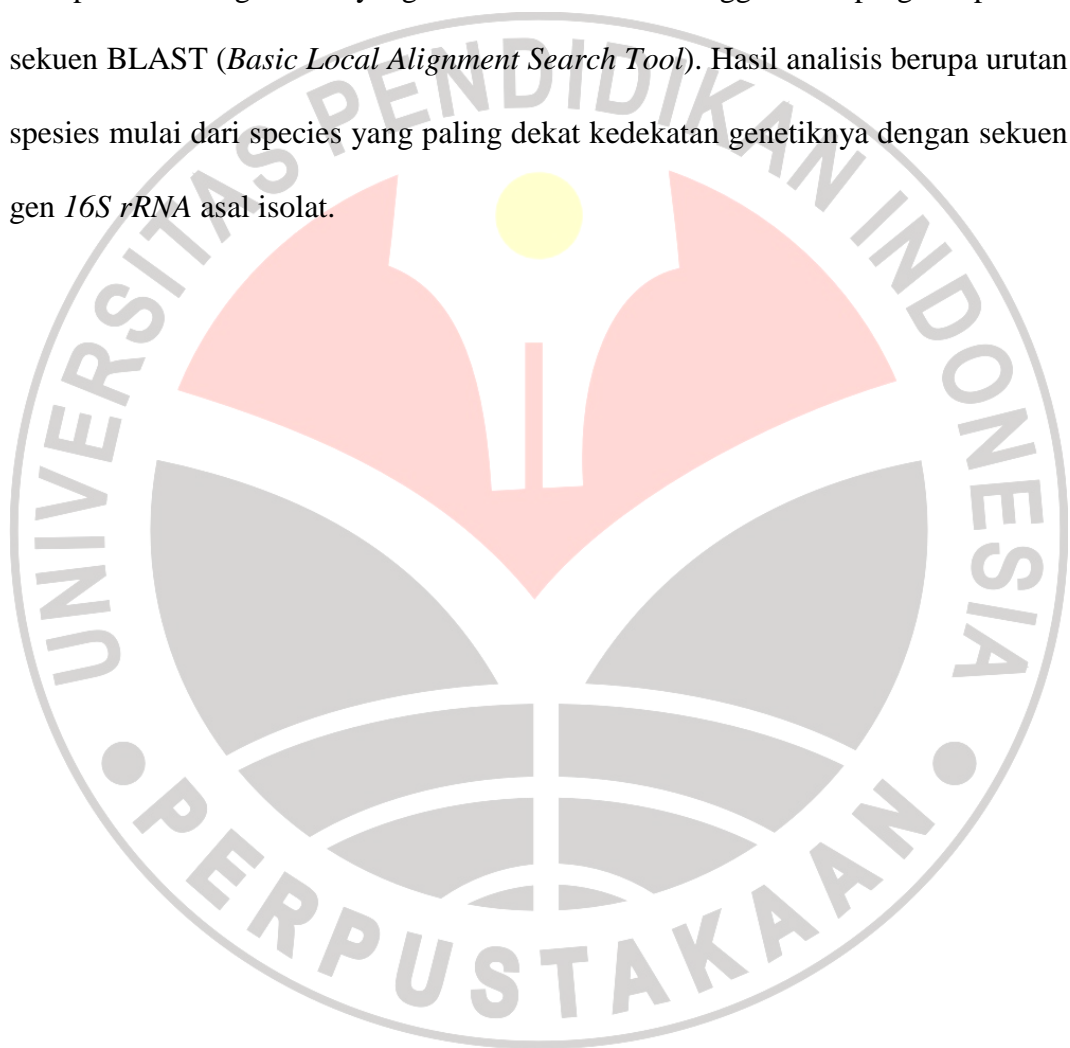
13) Sekuensing menggunakan Analisis gen *16S rRNA*

Proses sekuensing dilakukan dengan mesin *sequencer*, karena keterbatasan fasilitas di laboratorium, proses sekuensing dilakukan di laboratorium lain.

F. Analisis Data

Untuk memperoleh hasil identifikasi isolat pendegradasi kitin tertinggi sampai tingkat taksa spesies atau subspecies dilakukan analisis sekuen gen *16S rRNA* menggunakan bioinformatika secara *online*. Hasil Sekuensing dibandingkan

(pensejajaran) dengan data gen *16S rRNA* yang ada di Bank Gen NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) di alamat server <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi> atau “*GenBank*” yang lain. Hal ini bertujuan untuk melihat homologi dan komparasi fragmen sekuen yang berhasil diamplifikasi dengan data yang ada secara online menggunakan program pencari sekuen BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hasil analisis berupa urutan spesies mulai dari species yang paling dekat kedekatan genetiknya dengan sekuen gen *16S rRNA* asal isolat.



G. Alur Penelitian

