

## **BAB III**

### **BAHAN DAN METODE**

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

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode deskriptif (Nazir 1983).

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

Populasi dalam penelitian ini adalah populasi bakteri endofit yang terdapat dalam tumbuhan akar *Ageratum conyzoides* L. sedangkan untuk sampel populasi bakteri endofit yang terdapat dalam tumbuhan *A. conyzoides* L. yang berada di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia.

#### **C. Objek Penelitian**

Objek penelitian ini adalah materi genetik (DNA) yang menyandi gen 16S *rRNA* bakteri endofit *A. conyzoides* L.

#### **D. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret 2011 sampai bulan Agustus 2011 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia.

## **E. Cara Kerja**

### **1. Pengambilan sampel**

Isolasi mikroba endofit dilakukan menurut metode F. Tomita. Akar tanaman *A. conyzoides* dikoleksi dari Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia dan kemudian sampel tanaman dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir. Setelah itu, dilakukak sterilisasi permukaan menggunakan larutan etanol 75% selama 1 menit, Bayclin 25% selama 5 menit, dan terakhir dengan etanol kembali selama 30 detik. Setelah itu sampel dibilas dengan aquades steril beberapa kali. Selanjutnya, potongan tadi direndam dalam larutan fisiologis sambil divortex untuk mengeluarkan bakteri endofit dalam jaringan tumbuhan (Modifikasi Lumyong *et al.*, 2001).

### **2. Isolasi DNA**

Isolasi DNA ini dilakukan menggunakan metode isolasi DNA langsung dari alam yakni bakteri yang akan diisolasi tidak dikultur terlebih dahulu, melainkan langsung diambil dari akar *A. conyzoides*. Air rendaman akar diambil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* volume 1,5 mL. Selanjutnya tabung *ependorf* yang berisi air rendaman akar tersebut di pusingkan selama 3 menit dengan kecepatan 7.500 rpm. Setelah itu, *supernatant* (cairan bagian atas) dibuang. Pelet yang diperoleh selanjutnya diisolasi menggunakan metode yang tersedia pada katalog “*FERMENTAS DNA Purification Kit*”

### 3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Isolat DNA sebanyak 3  $\mu\text{L}$  dimasukkan dalam tabung PCR yang berisi 17,875  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu\text{L}$  dNTP 10 mM, 0,125  $\mu\text{L}$  enzim *Taq Polimerase* 10U/ $\mu\text{L}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  buffer *Taq Polymerase* 10X, 0,5  $\mu\text{L}$  primer 63f 0,4 mmol, 0,5  $\mu\text{L}$  primer 1387r 0,4 mmol (Marchesi *et al.* 1998). Selanjutnya dilakukan perbanyakan sampel DNA menggunakan mesin PCR *ependorf tube* dengan kondisi : *pre start* 95°C 5 menit, denaturasi 94°C 1 menit, *annealing* primer 56°C 1 menit, *extention* 72°C 1 menit yang dilakukan sebanyak 30 siklus ; *post PCR* 72°C 10 menit. Setelah itu suhu diturunkan dan diakhiri pada 4°C (Modifikasi Yusuf *et al.*, 2002).

### 4. **Elektroforesis hasil PCR**

Elektroforesis secara horizontal dilakukan pada agarose 0,8%, voltase sebesar 75 volt dan *dirunning* selama 45 menit dalam buffer TAE 1X dengan menggunakan alat elektroforesis *BIORAD*.

### 5. **Purifikasi hasil PCR**

Purifikasi (pemurnian) DNA dilakukan sesuai dengan petunjuk yang tersedia pada katalog “Promega” USA.

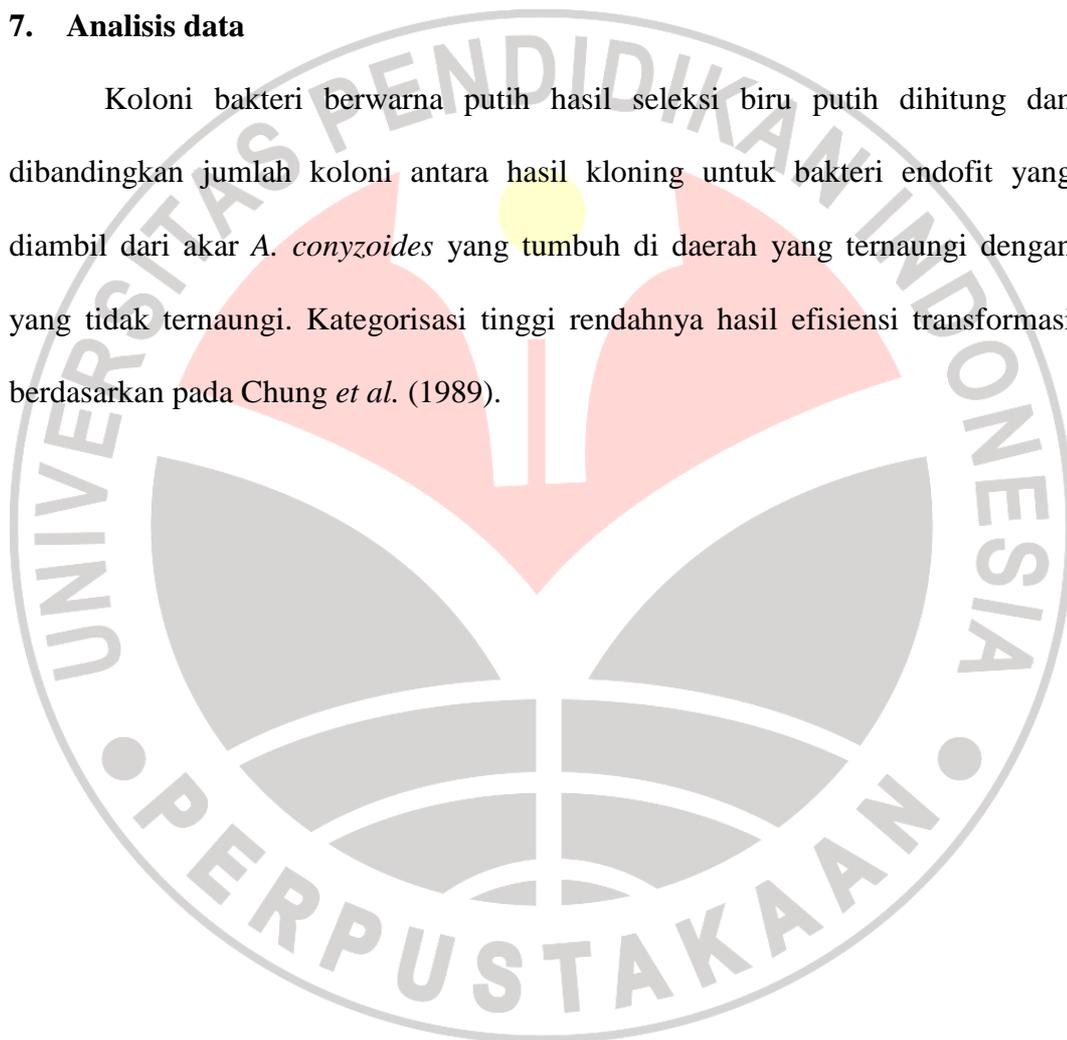
### 6. **Clon Gen 16S rDNA**

Gen 16S rDNA hasil purifikasi PCR diklon ke plasmid pGEMT *Easy* vector (Promega, Wisconsin), dan selanjutnya ditransformasi ke dalam

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook & Russel, 2001) diikuti dengan seleksi di atas media Luria Bertani agar (LA) (2 g tripton, 2 g NaCl, 1 g *yeast extract*, 3 g agar-agar, 200 mL aquades) yang telah dibubuhi ampisilin 100  $\mu\text{g/mL}$  dan X-gal 40  $\mu\text{g/mL}$ .

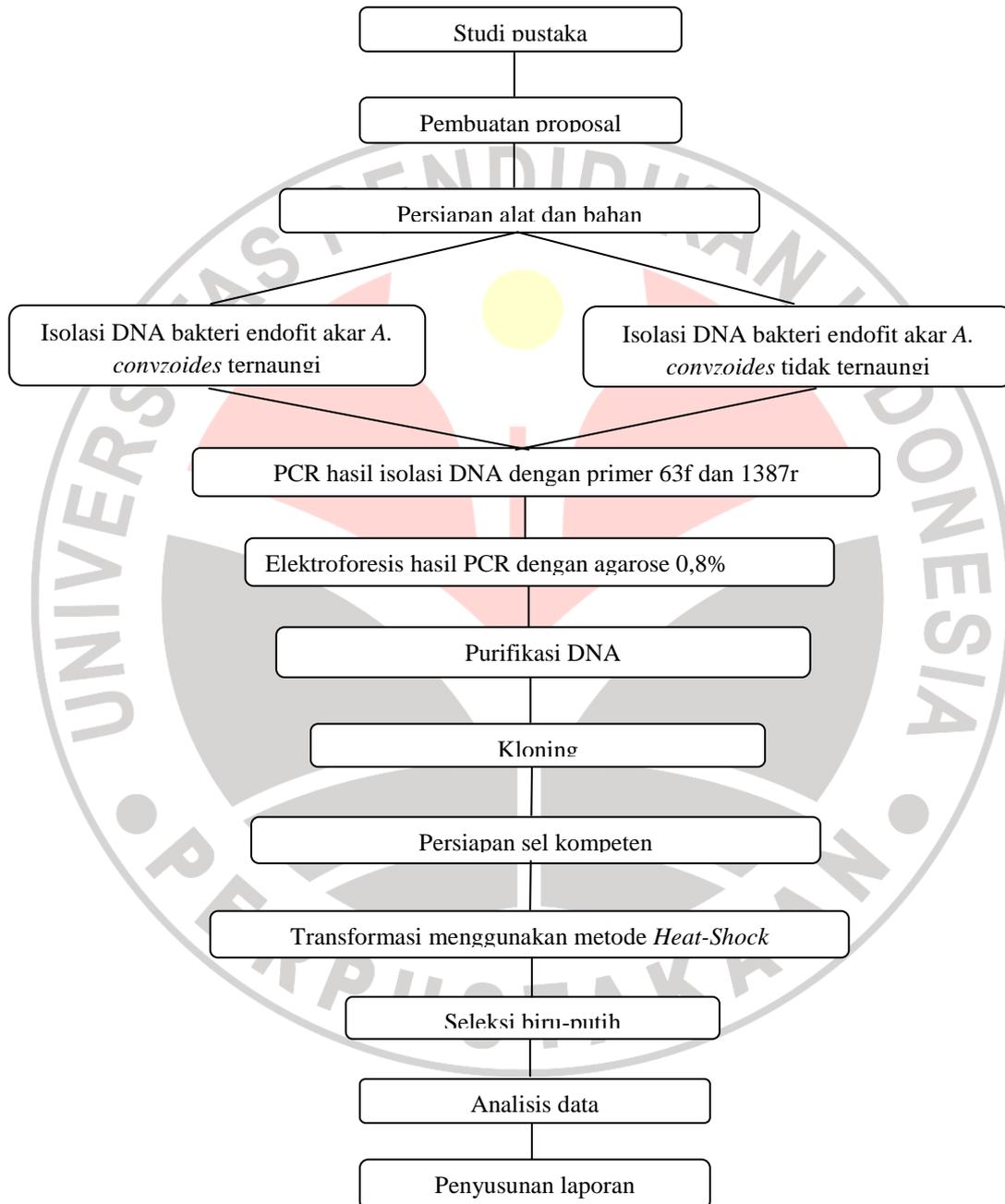
## 7. Analisis data

Koloni bakteri berwarna putih hasil seleksi biru putih dihitung dan dibandingkan jumlah koloni antara hasil kloning untuk bakteri endofit yang diambil dari akar *A. conyzoides* yang tumbuh di daerah yang ternaungi dengan yang tidak ternaungi. Kategorisasi tinggi rendahnya hasil efisiensi transformasi berdasarkan pada Chung *et al.* (1989).



## 8. Alur Penelitian

Skema alur penelitian “Kloning Gen 16S rDNA Bakteri Endofit Akar *A. conyzoides* L. pada Vektor pGEMT *Easy*” dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1.** Diagram alur penelitian kloning gen 16S rDNA bakteri endofit akar *A. conyzoides* L. pada vektor pGEMT *Easy*.