

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan dengan metode deskriptif. Penelitian deskriptif adalah suatu metode penelitian untuk membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 1988).

B. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel pada penelitian ini adalah sebanyak 17 isolat biakan murni bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L. Sampel didapatkan dari hasil penelitian sebelumnya (Permatasari, 2011), yang merupakan hasil isolasi dari akar tumbuhan *Vetiveria zizanioides* L. di Perkebunan Usar Kamojang, Kabupaten Garut.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret sampai Juli 2012. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini tercantum pada halaman Lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

1) Tahap Persiapan

Alat-alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke dalam *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1.5 atm. Medium Luria Bertani Agar (*LB Agar*) dan *LB broth* yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri endofit juga disterilkan selama 15 menit.

2) Tahap Penelitian

a. Isolasi Bakteri

Semua alat dan bahan yang akan digunakan disimpan di dalam *laminar air flow* dengan disinari UV terlebih dahulu selama 15 menit. Kemudian sebanyak 17 isolat bakteri yang diawetkan dalam *cryo buffer* penelitian sebelumnya ditumbuhkan kembali ke dalam medium *LB agar* untuk mendapatkan biakan murni dari setiap jenis bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L. Setiap isolat bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 2-4 hari.

b. Isolasi DNA Total (Genom)

Isolasi DNA total isolat bakteri dilakukan dengan menggunakan komersial kit, *DNA Purification Kit Fermentas* dengan beberapa modifikasi pada langkah proses isolasi. Tahap persiapan proses isolasi DNA adalah membuat kultur bakteri cair dari 17 isolat bakteri yang telah ditumbuhkan sebelumnya pada Medium LB (Luria Bertani) broth. Sebanyak 1,5 ml kultur cair bakteri masing-masing dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi steril. Sampel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang hingga yang tersisa di dalam tabung hanya endapan sel bakteri saja (pelet). Kemudian ditambahkan 200 µl larutan *TE buffer* lalu diresuspensikan hingga homogen. Selanjutnya, ditambahkan 400 µl larutan *lysis solution* ke dalam tabung *ependorf*. Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, kemudian ditambahkan 600 µl kloroform ke dalam tabung tersebut dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik 3-5 kali. Sentrifugasi suspensi pada tabung tersebut pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Setelah sentrifugasi, fasa cair atas yang terbentuk dipindahkan pada tabung mikrosentrifugasi yang baru dan ditambahkan 800 µl larutan presipitasi (80 µl larutan *precipitation solution* dilarutkan dengan 720 µl ddH₂O steril) lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang secara hati-hati lalu ditambahkan 100 µl *NaCl solution* (1,2 M) dan pastikan pelet DNA larut. Kemudian ditambahkan *RNase A free DNase* sebanyak 10 µl lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 300 µl etanol absolut dingin, kemudian disimpan pada suhu

-20°C selama 1-20 jam. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan pada lapisan atas dibuang secara hati-hati sampai habis. Tutup tabung mikrosentrifugasi 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.

c. Pengukuran dan Pengenceran Konsentrasi DNA.

Penentuan konsentrasi DNA yang telah diisolasi dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA pada spectrophotometer dengan panjang gelombang 260 nm. Kemudian dihitung juga kemurnian DNA dengan menghitung rasio absorbansi 260 dan 280 nm. Setelah diketahui konsentrasi dan kemurnian setiap sampel DNA, kemudian dilakukan pengenceran DNA. Konsentrasi DNA dari setiap sampel disamakan dengan tujuan agar kualitas produk amplifikasi yang dihasilkan bersifat homogen. Konsentrasi DNA yang baik digunakan sebagai *template* dalam proses amplifikasi adalah sekitar 1pg-1µg (Sambrook & Russel, 2001).

d. Amplifikasi DNA (PCR)

Amplifikasi DNA yang dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russel (2001) serta Moffit & Neilan (2002), dengan sedikit modifikasi pada beberapa hal, yaitu suhu *annealing* dan waktu yang digunakan pada beberapa tahap PCR. Komposisi mix PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA adalah dengan menggunakan bahan-bahan kit Fermentas untuk PCR standar, yaitu *buffer enzim*

10x sebanyak 2,5 µl hingga konsentrasi akhir 2,5 mM, dNTPs (*mix*) sebanyak 2,5 µl dengan konsentrasi akhir 2 mM tiap dNTP, serta enzim *Taq polymerase* dengan konsentrasi akhir 1,25 U/µl. Amplifikasi gen *Ketosynthase* (KS) menggunakan pasangan primer *degenerate oligonucleotide* yang meliputi primer *forward* DKF dan primer *reverse* DKR, serta pasangan primer *heterocysts glycolipid* yang meliputi primer *forward* HGLF dan primer *reverse* HGLR (Moffit & Neilan, 2002). Adapun primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *16S rRNA* adalah primer *forward* 63F dan primer *reverse* 1387R (Marchesi *et al.*, 1998). Pasangan-pasangan primer tersebut ditambahkan dalam *mix PCR* dengan konsentrasi masing-masing 0,5 µM sebanyak 1,25 µl. Kemudian ditambahkan sebanyak 1 µl DNA bakteri dengan konsentrasi 100 ng/µl sebagai DNA *template* dan ditambahkan *Aqua bidestilata* (ddH₂O) steril hingga volume akhir 25 µl.

Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (*MasterCycler Eppendorf*) yang telah diatur program atau profil untuk amplifikasi gen *ketosynthase*, yaitu *pre denaturasi awal* pada suhu 94°C selama 5 menit, *denaturasi* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 51°C untuk pasangan primer DKF-DKR dan 47°C untuk pasangan primer HGLF-HGLR masing-masing selama 1 menit, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, tahap *extension* akhir pada suhu 72°C selama 7 menit dan tahap inkubasi pada suhu 4°C tanpa batas waktu. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen *16S rRNA* dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Marchesi *et al.*, (1998) yaitu *pre denaturasi awal* pada suhu 95°C selama 5 menit, *denaturasi* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, 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 2% dalam buffer TBE 0.5X untuk melihat kualitas hasil amplifikasi.

e. Elektroforesis DNA

Untuk melakukan proses elektroforesis, terlebih dahulu menyiapkan *tray* atau cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Posisi cetakan harus dipastikan telah berada pada bidang datar dengan menggunakan *waterpass*. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 2% dalam buffer TBE 0.5X. Gel agarose dididihkan menggunakan *microwave* hingga agar larut dan berwarna bening. Kemudian gel agarose didiamkan hingga hangat-hangat kuku lalu dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*). Sisir dipasang dengan posisi tegak dan berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Selanjutnya gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang.

Gel dan cetakan direndam pada *buffer* TBE 0.5X pada kolom elektroforesis. Larutan sampel (amplikon hasil PCR) dari freezer diambil sebanyak 5-8 µl. Kemudian dicampurkan dengan 2 µl *loading dye*. Sampel dimasukkan ke dalam sumur yang terdapat dalam gel pada kolom elektroforesis. Setelah sampel dimasukkan, kemudian dielektroforesis pada tegangan 75 volt selama 45 menit (Permatasari, 2011). Pewarnaan gel hasil elektroforesis dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russel (2001). Gel berisi DNA hasil elektroforesis diwarnai menggunakan larutan *Ethidium Bromide* (EtBr) dengan konsentrasi 0.5 µg/ml

selama 5 menit, kemudian dibilas dengan *deion water* steril untuk membuang kelebihan EtBr. Gel hasil elektroforesis diamati dengan sinar UV (UV *transluminator*), fragmen DNA yang muncul didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital merk *Canon PowerShot A495*.

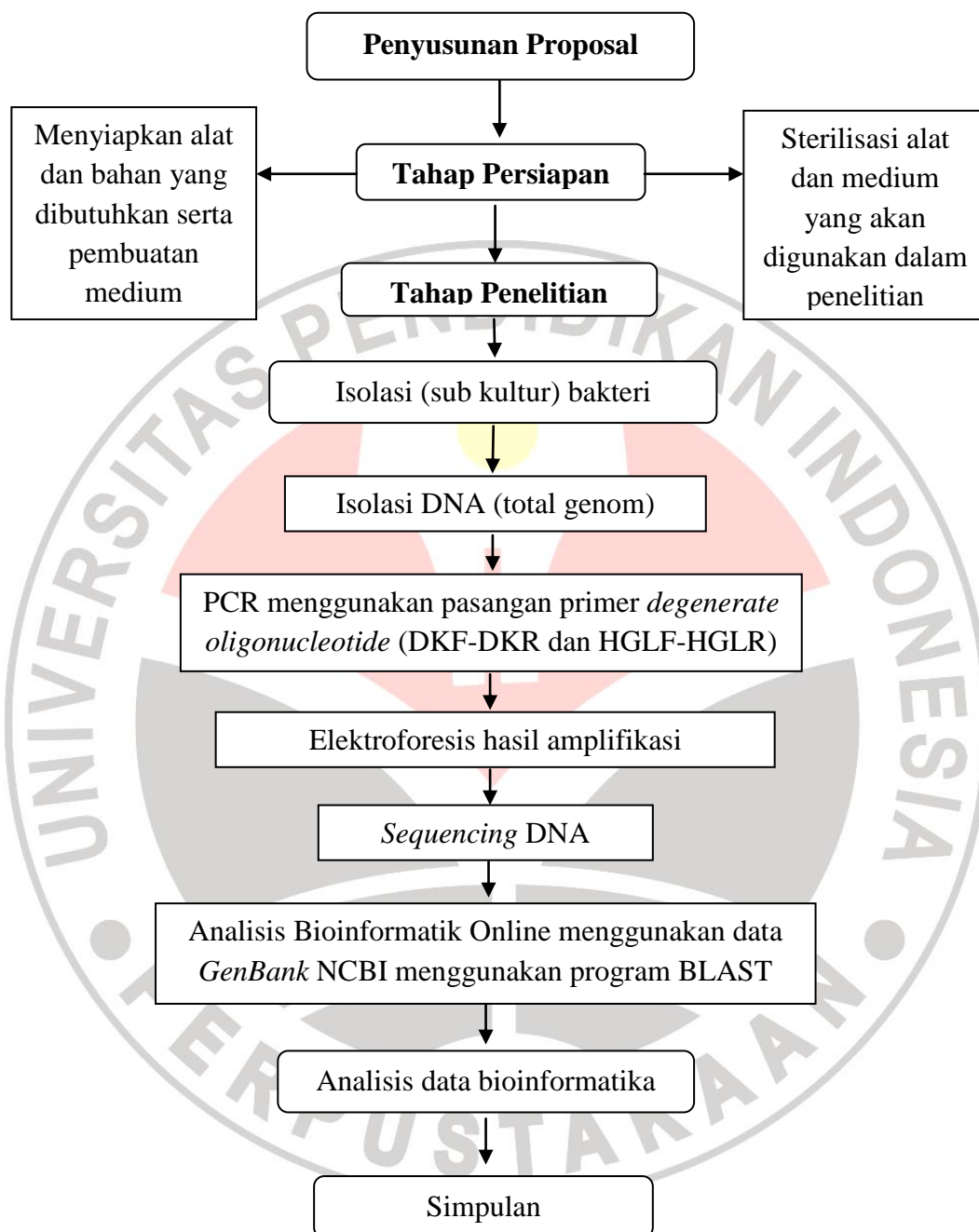
f. *Sequencing* DNA

Proses *sequencing* DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *sequencer* BigDye Applied Biosystem model 3730 yang dilakukan di Macrogen inc., Korea.

F. Analisis Data Bioinformatika

Isolat bakteri endofit yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* diidentifikasi sampai tingkat taksa spesies melalui analisis sekuens gen *16S rRNA* dengan menggunakan metode bioinformatika (BLAST) secara *online*. Setiap sekuens gen *ketosynthase* yang didapatkan dari proses *sequencing* diterjemahkan terlebih dahulu menjadi kode asam amino. Kemudian setiap sekuens asam amino tersebut disejajarkan dan dibandingkan dengan data sekuens gen *ketosynthase* yang terdapat pada *database* Bank Gen NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) di alamat website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>. Proses *alignment* dari setiap sekuens asam amino gen *ketosynthase* menggunakan program *tool multiple-sequence alignment* dari software *Clustal X* dan software MEGA (*version 5*) untuk menganalisis filogenetik bakteri endofit tersebut melalui pohon filogenetik yang dihasilkan.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Diagram Alur Penelitian