

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk dalam penelitian dasar yang dilakukan dengan metode deskriptif (Nazir, 1998).

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah populasi bakteri ektorizosfer yang terdapat dalam tanah sekitar akar *Ageratum conyzoides* dari Kebon Botani FPMIPA UPI.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNA bakteri ektorizosfer *A. conyzoides*.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan Februari sampai Oktober 2011 yang dilaksanakan Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI, Jalan Dr. Setiabudhi 229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi UPI. Alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini terdapat dalam Lampiran 2 dan Lampiran 3.

E. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel tanah akar *Ageratum conyzoides* dilakukan di Kebun Botani FPMIPA UPI Bandung. Sampel diambil di dua tempat, yaitu daerah ternaung dan daerah terbuka. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan peralatan steril yang telah disterilisasi panas lembab dan disemprot dengan alkohol 70%. Pengambilan dilakukan dengan cara menggali tanah di sekitar perakaran *A. conyzoides* yang sudah berbunga secara perlahan-lahan menggunakan sendok tanah. Akar dipisahkan dari bongkahan tanah besar dan membiarkan sebanyak mungkin tanah yang melekat pada akar. Kemudian akar beserta tanah yang melekat dimasukkan ke dalam cawan Petri (steril), diberi label, dan dimasukkan ke dalam termos es agar tidak cepat kering.

2. *Enrichment Media*

Sebanyak 1 gram tanah yang melekat di akar diambil dengan menggunakan peralatan steril. Tanah dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 5 ml NaCl 0,85%, dihomogenkan dengan cara di *vortex* selama 30 menit. Kemudian campuran tanah diendapkan selama 15 menit. Supernatan kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam medium Luria Bertani (LB) *Broth*. Medium diinkubasi sambil dihomogenkan dengan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 16 jam

dalam suhu ruang (modifikasi Sambrook & Russel, 2001; Wahyudi *et al.*, 2010).

3. Isolasi DNA

DNA total isolat bakteri ektorizosfer diisolasi menggunakan *DNA Purification Kit* (FERMENTAS, Lithuania) dengan beberapa modifikasi pada beberapa langkah proses isolasi. Kultur bakteri yang telah berumur ± 16 jam dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 1,5 ml. Sampel tersebut disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 7.500 rpm. Bagian supernatan dibuang, sehingga yang tersisa hanya pelet. Selanjutnya ditambahkan 200 μ l NaCl 0,85% dan dihomogenkan. Tabung berisi pelet tersebut ditambahkan 400 μ l *Lysis solution* dan diinkubasi dalam suhu 65°C selama 15 menit sambil digoyang untuk memaksimalkan kontak larutan dengan sel bakteri. Setelah diinkubasi selama 15 menit, ke dalam sampel tersebut ditambahkan *Chloroform* sebanyak 600 μ l kemudian dibolak-balikkan 3-4 kali lalu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Langkah selanjutnya yaitu memindahkan fase atas hasil sentrifugasi ke dalam tabung *ependorf* baru lalu fase atas tersebut ditambahkan dengan 800 μ l larutan presipitasi yang telah disiapkan sebelumnya. Kemudian sampel dibolak-balikkan selama 1-2 menit pada suhu ruangan lalu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Fasa cair dibuang dengan hati-hati, sehingga yang tertinggal dalam tabung hanya pelet DNA saja.

Setelah itu ke dalam pelet ditambahkan 100 µl ddH₂O dingin steril, kemudian pelet dilarutkan dengan dijentik-jentikkan dengan jari tangan sampai pelet tersebut benar-benar larut. Apabila pelet sudah larut maka ke dalam campuran pelet DNA tersebut ditambahkan 300 µl alkohol absolut dingin kemudian disimpan pada freezer bersuhu -20°C selama 24 jam. Campuran DNA tersebut disentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Buang alkohol kemudian keringkan pelet DNA. Setelah pelet kering, pelet DNA tersebut dilarutkan dengan 10 µl ddH₂O dingin steril, lalu disimpan pada suhu -20°C sampai sampel tersebut digunakan untuk PCR.

4. Amplifikasi gen 16S rDNA

Amplifikasi gen 16S rDNA pada penelitian ini mengacu pada proses amplifikasi yang dilakukan oleh Marchesi *et al.* (1998). Campuran reaksi PCR untuk mengamplifikasi gen 16S rDNA terdiri dari: 1 µL DNA genom, *buffer* enzim (NEB, U.S.A) 10x sebanyak 2,5 µl hingga konsentrasi akhir 2,5 mM, 0,5 µl dNTP 10 mM, 0,25 µl enzim *Taq Polimerase* 10U/µl, 0,5 µl primer 63F 0,4 mmol, 0,5 µl primer 1387R 0,4 mmol, dan 19,75 µl ddH₂O.

Selanjutnya tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Eppendorf*) yang diprogram untuk melaksanakan beberapa kondisi, yaitu pre denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 56°C selama 1 menit, *extention*

pada suhu 72°C selama 1 menit, *post* PCR pada suhu 72°C selama 10 menit, dan tahap inkubasi pada suhu 4°C tanpa batas waktu. Reaksi amplifikasi pada mesin PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Amplikon dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% dalam *buffer* TAE 1X untuk melihat kualitas hasil amplifikasi.

5. 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 menggunakan *hotplate* atau *microwave* sampai agar larut dan berwarna bening. Gel agarosa yang sudah hangat dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan *comb* dan dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel dan cetakannya kemudian direndam dalam *buffer* TAE 1X pada kolom elektroforesis. Larutan sampel (amplikon hasil PCR) diambil sebanyak 5 µl kemudian dicampurkan dengan 2 µl *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur. Elektroforesis secara horizontal dilakukan pada agarosa 0,8%, voltase sebesar 75 volt dan *dirunning* selama 45 menit dengan menggunakan *buffer* TAE 1X dalam alat elektroforesis *BioRad*.

6. Purifikasi DNA Produk PCR

Fragmen DNA hasil PCR yang telah dianalisis melalui proses elektroforesis selanjutnya dipurifikasi (pemurnian) mengikuti prosedur

dari katalog *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, USA). Setelah DNA produk PCR dipurifikasi, kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometri dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{Faktor Pengenceran}$$

7. Kloning gen 16S rDNA

Gen 16S rDNA hasil PCR diklon ke plasmid pGEM-T *Easy vector* (Promega, USA). Sebanyak 11 μl ddH₂O, 2 μl 2X *Buffer* ligasi, 1 μl vektor pGEM-T *Easy*, 5 μl insert dan 1 μl enzim Ligase dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* steril. Setelah itu sampel disimpan pada suhu 4°C dan diamkan bermalam. Kemudian sampel dipindahkan ke *freezer* bersuhu -20°C.

8. Transformasi hasil kloning

Transformasi DNA dan penyiapan sel kompeten dilakukan dengan teknik CaCl₂ dingin menurut metode Sambrook & Russel (2001). Sel *E. coli* yang telah dikultur 16 jam di medium LB *Broth* diambil sebanyak 250 μl dan dipindahkan ke medium LB *Broth* baru, kemudian diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C dan 125 rpm. Setelah itu sebanyak 1,5 ml sel *E. coli* berusia 3 jam tersebut dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* steril baru kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Supernatan dibuang, kemudian pelet dicuci dengan larutan

NaCl 0,1 M pH 7 dingin, kemudian pelet dihomogenkan setelah itu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambahkan dengan 200 μ l CaCl₂ dingin, selanjutnya pelet dihomogenkan dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu 0°C.

Sebanyak 200 μ l sel kompeten ditambahkan 20 μ l DNA hasil kloning, kemudian didiamkan pada suhu 0°C selama 30 menit. Setelah itu sampel dikejutkan dengan kejut panas (*Heat shock*) pada suhu 42°C selama 1 menit, kemudian dengan segera dipindahkan ke es dan didiamkan selama 5 menit. Setelah itu sampel ditambahkan 250 medium LB *Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam sambil digoyang dengan kecepatan 125 rpm. Langkah selanjutnya yaitu sampel yang telah diinkubasi selama 1 jam tersebut disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Supernatannya dibuang, kemudian ditambahkan kembali dengan medium LB *Broth* sebanyak 200 μ l, lalu sampel dihomogenkan. Setelah itu sampel disebarkan ke dalam medium LA yang telah ditambahkan X-gal (40 μ g/ml) dan ampisilin (100 μ g/ml) masing-masing 100 μ l kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk seleksi Biru-Putih.

9. Seleksi biru putih

Hasil transformasi disebarkan ke dalam medium yang berisi X-gal dan ampisilin masing-masing sebanyak 100 μ l. Selanjutnya medium yang

berisi bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu koloni yang tumbuh diamati warna koloninya. Apabila koloni bakteri yang tumbuh berwarna putih maka dapat dipastikan bahwa koloni tersebut berhasil disisipi DNA asing. Akan tetapi apabila koloni yang tumbuh berwarna biru maka koloni bakteri tersebut tidak berhasil disisipi DNA asing.

10. Isolasi DNA Plasmid

Isolasi DNA plasmid dilakukan mengikuti prosedur yang tersedia pada katalog EZ-10 Spin Column (BIO BASIC, Canada). Sebanyak 1,5 mL kultur bakteri transforman berusia 16 jam dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* steril kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan hasil sentrifugasi kultur bakteri transforman dibuang, kemudian ditambahkan 100 μ L *solution* I dan dihomogenkan. Larutan diinkubasi selama 1 menit pada suhu kamar dan ditambahkan 200 μ L *solution* II, lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 1 menit pada suhu kamar. Campuran kemudian ditambahkan 350 μ L *solution* III dan dicampur dengan hati-hati. Selanjutnya sampel disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke EZ-10 *column* lalu disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 2 menit. Cairan yang terdapat pada *collection tube* dibuang, lalu ditambahkan 500 μ L *wash solution* ke dalam tabung EZ-10 yang berisi sampel tersebut, setelah itu disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit. Cairan yang berada di

collection tube dibuang, lalu campuran ditambahkan kembali 500 μL *wash solution* dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama seperti di atas.

Cairan dibuang, kemudian tabung EZ-10 disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 1 menit. Tabung EZ-10 dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* baru steril dan ditambahkan 20 μL ddH₂O steril, didiamkan selama 2 menit pada suhu kamar, kemudian sampel disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit. DNA hasil isolasi plasmid disimpan pada suhu -20°C sampai DNA tersebut siap untuk digunakan.

11. Amplifikasi DNA plasmid

Amplifikasi DNA plasmid dilakukan menggunakan prosedur Marchesi *et al.* (1998). Komposisi *mix* yang digunakan dalam amplifikasi ini adalah DNA plasmid sebanyak 0,5 μL dimasukkan dalam tabung PCR yang berisi 20,375 μL ddH₂O, 0,5 μL dNTP 10 mM, 0,125 μL enzim *Taq Polimerase* 10U/ μL , 2,5 μL *buffer Taq Polymerase* 10X, 0,5 μL primer 63F 0,4 mmol, 0,5 μL primer 1387R 0,4 mmol.

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.

12. Restriksi gen 16S rDNA

Untuk digesti restriksi pada penelitian ini digunakan dua enzim restriksi endonuklease, yaitu *MspI* dan *HhaI* (NEB, USA). Sebanyak 12 μL ddH₂O steril, 2 μL *buffer* enzim, 5 μL DNA plasmid (gen 16S rDNA hasil PCR plasmid) dan 1 μL enzim restriksi (untuk 1 kali reaksi restriksi per enzim) dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 jam. Selanjutnya, hasil restriksi di elektroforesis dengan menggunakan agarosa 1,2% pada tegangan 75 volt selama 45 menit dengan menggunakan alat elektroforesis *Biorad*.

F. Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan pola larik DNA pada gel agarosa. Larik DNA yang dianalisis adalah larik yang hadir dan jelas terlihat oleh mata, tanpa memperhitungkan intensitasnya. Selanjutnya larik DNA hasil elektroforesis diinterpretasikan menjadi angka satu (1) untuk kehadiran larik dan angka nol (0) untuk ketidakhadiran larik. Selanjutnya data biner hasil pemotongan dengan enzim restriksi digunakan untuk menyusun matriks kesamaan genetik berdasarkan rumus Nei dan Li (1979) dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic*) menggunakan *software* MVSP 3.2. Dari hasil analisis data ini akan didapatkan pohon filogenetik.

Untuk mendapatkan tingkat keragaman dari bakteri ektorizosfer digunakan Indeks Shannon-Wiener yang diadaptasi dari metode ekologi. Dari data biner

yang didapatkan, setiap sampel yang memiliki pola larik sama dihitung dengan menggunakan rumus:

$$H' = - \sum P_i \ln P_i$$

dimana

$$P_i = \frac{n_i}{n}$$

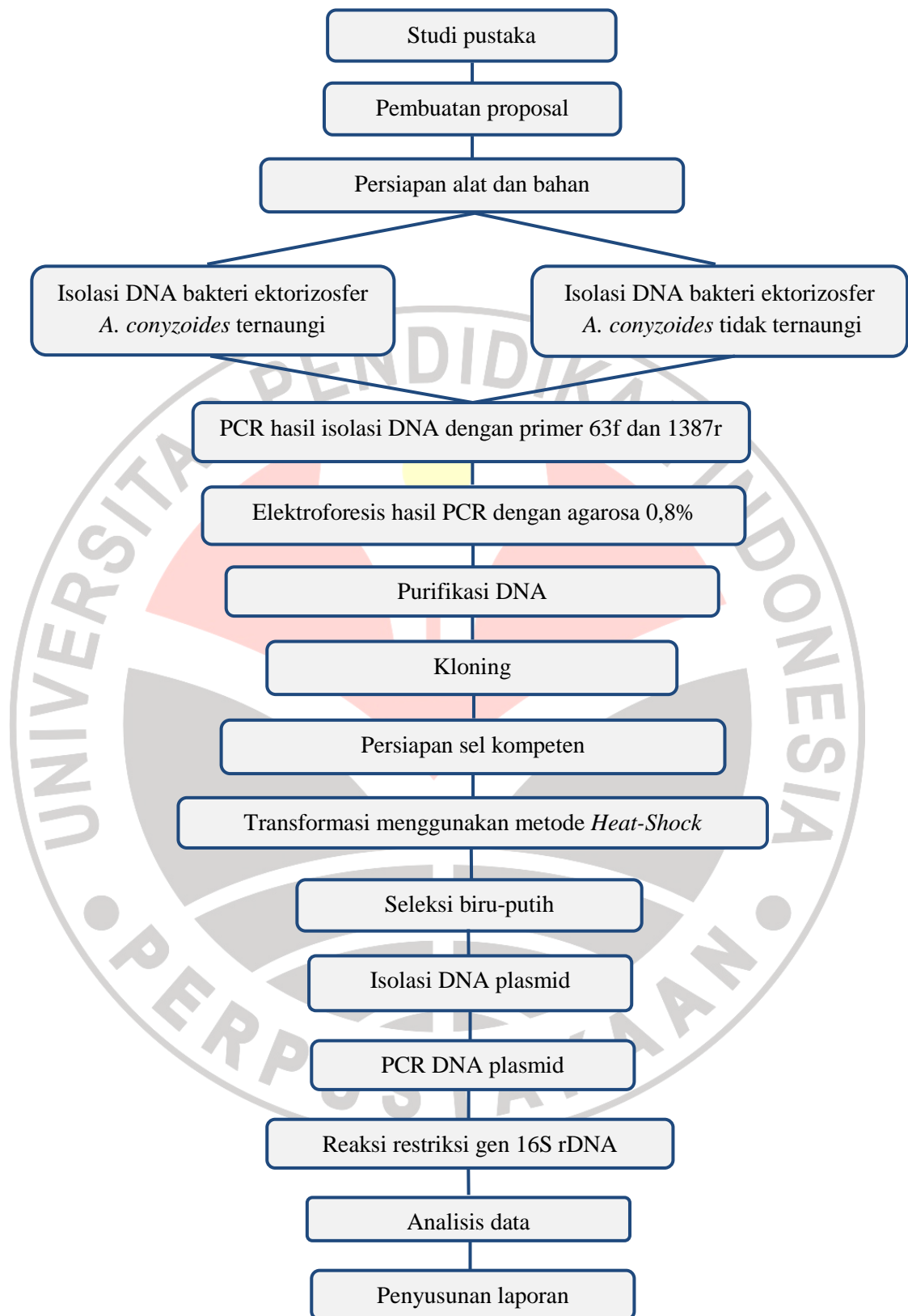
Keterangan:

n_i = jumlah individu tiap spesies dalam sampel

n = adalah jumlah total individu dalam dalam sampel.

G. Alur Penelitian

Skema alur penelitian “**Keragaman dan Hubungan Kekerbatan Bakteri Ektorizosfer *Ageratum conyzoides* dengan Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)**” dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian