

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian dasar dengan metode deskriptif, yaitu metode penelitian yang dibuat 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 dalam penelitian ini adalah seluruh bakteri termofilik asal perairan Ciengang, Kawah Darajat Garut dan populasi bakteri termofilik asal *Hydrothermal vent*, Kawio. Sampel yang digunakan diambil sebanyak 15 liter dari sumber air panas Ciengang dengan temperatur air 50°C pH 7 dan 15 liter dari Kawah Darajat Garut dengan temperatur air 90°C kondisi pH 3. Sedangkan sampel yang berasal dari kawasan *hydrothermal vent* memiliki temperatur air berkisar 250–300°C dan keadaan pH 6,5. Jenis sampelnya merupakan campuran dari air panas dengan sedikit sedimen. Bakteri termofil asal kawasan *hydrothermal vent* Kepulauan Kawio di *enrichment* pada medium *Buhsnell Haas Mineral Salt* (BHMS) dengan penambahan sumber karbon (glukosa dan gliserol) dengan volume medium masing-masing mencapai 500 ml pada suhu 60 °C.

C. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah DNA dari bakteri termofilik sumber air panas Ciengang, Kawah Darajat Garut dan Asal *hydrothermal vent* Kawio yang di *enrichment* pada medium *Buhsnell Haas Mineral Salt* (BHMS).

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian ini dimulai dari bulan September 2014 sampai bulan Januari 2015. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika gedung

Pusat Antar Universitas (PAU), Sekolah Ilmu Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung, dan Laboratorium Mikrobiologi FPMIPA UPI. Sedangkan Waktu pelaksanaan pengambilan sampel pada bulan Desember 2014 di sumber mata air Ciengang, Garut dan Januari 2015 pengambilan sampel air panas di Kawah Darajat, Garut.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Rekayasa Genetika gedung Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam **Lampiran I**.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Persiapan penelitian meliputi sterilisasi alat dan bahan, pembuatan medium untuk pengkayaan bakteri, isolasi genom dan elektroforesis. Medium tumbuh yang digunakan adalah medium *Buhsnell Haas Mineral Salt* (BHMS). Alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan plastik tahan panas yang selanjutnya disterilisasi panas lembab pada autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 10-15 menit.

a. Pengambilan sampel

Sampel diambil pada daerah Ciengang yang termasuk kedalam kecamatan Tarogong Kaler dan Kawah Darajat, Garut. Sampel diambil sekitar 5-15 liter sampel air. Parameter yang diukur pada saat pengambilan sampel yaitu suhu air dengan menggunakan thermometer alkohol yang dicelupkan selama 3 menit pada titik pengambilan sampel setelah suhu air mencapai batas maksimal maka hasil pengukuran suhu tersebut dicatat. Selain pengukuran suhu, parameter yang kedua yaitu pengukuran pH dengan menggunakan pH universal (Merk) yang dicelupkan ke permukaan air kemudian bandingkan hasil dengan menyesuaikan standar pengukuran pH sesuai warna pH yang tertera. Sampel air sebanyak 5-15 liter

Meli, 2014

Isolasi DNA Genom Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Ciengang, Kawah Darajat dan Hydrothermal Vent Kawio

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dimasukkan kedalam termos atau botol steril dan ditutup dengan rapat bisa menggunakan alumunium foil dan plastik yang diikat rapat menggunakan karet yang selanjutnya sampel air tersebut dibawa ke Laboratorium untuk di isolasi.

b. Pembuatan Medium Campuran BHMS dan sumber karbon Gliserol dan Glukosa

Bushnell Haas Mineral salts (BHMS) digunakan sebagai medium pertumbuhan bakteri dari sampel air *hydrothermal vent* Kawio dibuat masing-masing terlebih dahulu secara terpisah. Medium BHMS cair disiapkan dengan komposisi 1 g/l KH_2PO_4 , 0,2 g/l K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g CaCl_2 , 1 g NH_4NO_3 dan 2 tetes FeCl_3 60% kemudian ditambahkan *aquades* sampai 1 liter (Cappello *et al.*, 2012). Selanjutnya ditambahkan 30 mM gliserol ke dalam larutan medium BHMS setelah itu, *adjust* pH sampai $7,0 \pm 0,2$. Setelah medium selesai dibuat secara terpisah, kemudian langkah selanjutnya adalah membuat medium campuran *Buhsnell Haas Mineral Salt* (BHMS) disterilisasi dengan cara dimasukan ke dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C .

2. Tahap Penelitian

a. Enrichment

Sampel air laut dalam telah diambil dari kawasan *hydrothermal vent* Kawio. Sampel yang dikumpulkan berupa air laut dan jumlahnya terbatas. Maka untuk memperkaya sampel dan menghindari terjadinya degradasi jumlah bakteri, dilakukan metode pengayaan (*enrichment*). Pengayaan dilakukan dengan menggunakan medium *Buhsnell Haas Mineral Salt* (BHMS). Sebanyak 10% sampel air laut dalam Kawio ditambahkan ke dalam 10 ml medium *Buhsnell Haas Mineral Salt* (BHMS). Penambahan ini dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow* untuk mencegah adanya kontaminasi. Kemudian diinkubasi dalam suhu 60°C . Setelah inkubasi *overnight* atau hingga sampel terlihat keruh, sebanyak 10% sampel hasil inkubasi diinokulasikan kembali ke dalam 100 ml medium *Buhsnell Haas Mineral Salt* (BHMS) dengan inkubasi pada keadaan yang sama. Baru setelah itu sampel hasil inkubasi diperbanyak dengan menginokulasikan 10%

sampel sampai diperoleh volume sampel dengan hasil yang maksimal, kemudian dapat digunakan untuk pengamatan dengan inkubasi pada keadaan yang sama.

b. Pengukuran *Optical Density* (OD)

Pengukuran *Optical Density* (OD) dilakukan dengan metode langsung berdasarkan turbiditas. Alat yang digunakan yaitu spektrofotometer. Pengecekan OD dilakukan setiap 1-2 jam sekali dengan cara 1 ml sampel dimasukkan ke dalam kuvet. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 600 nm.

c. Isolasi Genom

1. Preparasi CTAB:

Dalam tahap preparasi CTAB langkah awal adalah dengan mempersiapkan *Buffer* CTAB, *Buffer* TE, isopropanol, etanol 70% dan etanol 95%. Simpan *Isopropanol*, etanol dan *ammonium acetat* pada lemari es -20°C . Campurkan 5 ml *buffer* CTAB, 0,2 gram *polivinylpyrrolidone* (PVP) dan 25 μl beta mercaptoetanol. Kemudian, campuran *buffer* CTAB dan kertas saring dimasukan kedalam waterbath shaker dengan suhu 60°C inkubasi selama 1 jam. Selama proses inkubasi aduk *buffer* per 30 menit dan akan terbentuk gelembung jika terjadi guncangan yang cepat (Hidayat *et al.*, 2012)

2. Isolasi dengan metode CTAB

Metode isolasi CTAB berdasarkan metode Marshall (2011) dengan sedikit modifikasi oleh Hidayat *et al.*, (2012). Langkah awal Sebelum sampel diisolasi, Saring sampel air yang mengandung bakteri asal *hydrothermal vent*, Ciengang dan Kawah Darajat Garut. Saring sampel dengan menggunakan kertas saring microfiber ukuran pori 0,2 μm . Setelah sampel disaring, kemudian ambil masing-masing kertas penyaring sampel asal *hydrothermal vent* Kawio, Ciengang dan Kawah Darajat Garut setelah itu masukan kertas saring kedalam 15 ml *buffer* CTAB, homogenkan dengan cara di bolak-balik tabung 2-3 kali, setelah itu

inkubasi dalam waterbath 55°C selama 1 jam. Lakukan pengadukan per 30 menit. Isolasi dilakukan dengan mengambil 3 ml kultur dari buffer CTAB masukkan kedalam tabung mikro kemudian sentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga hanya pellet yang tersisa. Pellet hasil sentrifugasi ditambahkan dengan 1 ml kloroform: isoamil alkohol v/v (24:1) sentrifugasi selama 7 menit dengan kecepatan 13.200 rpm, ambil fasa atas pindahkan pada tabung yang baru hitung fasa air dan masukkan 0.08 µl ammonium acetat : isopropanol sebanyak 0,54 µl. Homogenkan campuran fasa tersebut dengan membolak-balik tabung sebanyak 30x atau diresuspensi menggunakan tips hingga tercampur rata. Setelah tercampur rata, kemudian disimpan dalam freezer -20°C selama 40 menit. Sentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.200 rpm, buang supernatan masukkan 700 µl etanol 70%, invert hingga homogen, sentrifuge sampel selama 1 menit dengan kecepatan 13.200rpm. Buang supernatan masukkan 700 µl etanol 75%, invert hingga homogen, sentrifuge sampel selama 1 menit dengan kecepatan 13.200 rpm. Supernatan yang terbentuk dibuang hingga tersisa pelletnya kemudian pelletnya dikeringkan pada suhu ruang. Setelah itu dilarutkan dengan menambahkan 25 µl TE buffer pH 8,0. *Flick* hingga homogen. Disimpan pada suhu -20°C.

d. Uji Kemurnian dengan Spektrofotometer

Cara kerja pengujian kuantitatif DNA genom hasil isolasi diukur melalui spektrofotometri sinar ultra violet dengan alat spektrofotometer UV Genesis, Thermocientific. Sampel DNA genom hasil isolasi diambil sebanyak 2 µl dan diencerkan dengan deion sampai 50x pengenceran. Sampel DNA genom yang sudah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung kuvet khusus selanjutnya dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer.

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Uji. Kemurnian genom DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ($\text{Å } 260 / \text{Å } 280$), sedangkan untuk mengukur konsentrasi DNA digunakan rumus sebagai berikut:

Meli, 2014

Isolasi DNA Genom Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Ciengang, Kawah Darajat dan Hydrothermal Vent Kawio

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

$$[\text{DNA}] = \text{Å } 260 \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

- Å 260 = Nilai absorbansi pada 260 nm
 50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan
 50 µg untai ganda DNA per ml

Nilai purity DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dan fenol dalam larutan. Molekul DNA dikatakan murni jika Å 260 / Å 280 tersebut berkisar antara 1,8 – 2,0. Jika nilai rasio Å 260 / Å 280 lebih kecil dari 1,8 maka masih ada kontaminasi protein, sedangkan apabila nilai rasio Å 260 / Å 280 lebih besar dari 2,0 maka masih ada kontaminasi fenol di dalam larutan DNA (Sulandari and M. Zein, 2003).

e. Elektroforesis Gel Agarose

Tahap elektroforesis dimulai dengan menyiapkan gel agarosa 0,7% untuk dicetak pada cetakan gel yang telah dipasang sisir sebagai sumur. Panaskan gel agarose yang baru dibuat diamkan hingga hangat kuku dan tuangkan kedalam cetakan setelah gel agarose dingin atau membeku kemudian ambil dan letakkan pada kolom elektroforesis. Tuangkan buffer TAE 1x kedalam kolom elektroforesis hingga gel agarose terendam. *Line* pertama pada sumur dimasukkan 8 µl marker (ladder 1 kb DNA), *line* berikutnya diisi dengan 3 µl sampel hasil isolasi genom yang dicampurkan dengan 2 µl *loading dye*. Setelah itu tegangan dipasang 100 volt dengan waktu elektroforesis selama 25 menit. DNA hasil *running* di elektroforesis kemudian diambil dan diberi pewarnaan dengan cara direndam dalam larutan *Ethidium Bromide* (EtBr) selama 3 menit, setelah itu bilas dengan aquadest untuk membuang kelebihan EtBr. Setelah diberi pewarnaan maka potongan pita dapat diamati pada UV transilluminator. Fragmen DNA yang muncul didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital. Penggunaan etidium bromida yaitu untuk mengikat DNA yang akan berfluoresensi di bawah sinar UV dan dapat memungkinkan visualisasi DNA pada sebuah Gel. Etidium bromida adalah mutagen yang kuat dan cukup beracun. Sarung tangan harus

Meli, 2014

Isolasi DNA Genom Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Ciengang, Kawah Darajat dan Hydrothermal Vent Kawio

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

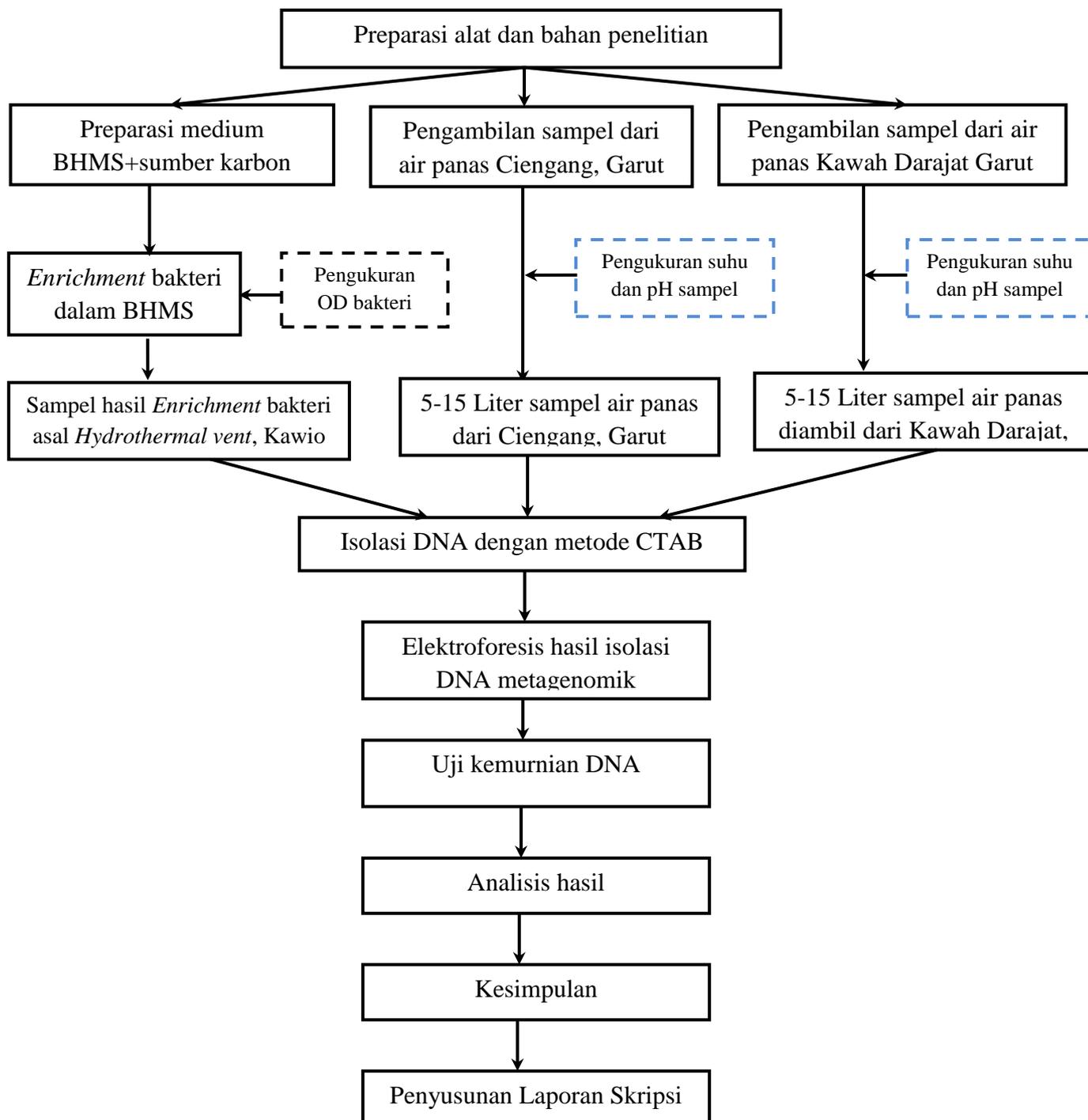
dipakai setiap saat. (Wibowo. 2008). Hasil elektroforesis akan didapatkan pita-pita protein yang terpisahkan berdasarkan berat molekulnya. Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Retnoningrum, 2007). Hasil positif elektroforesis gel agarosa adalah munculnya pita yang berpendar jika gel dilihat di bawah sinar UV. Hasil negatif elektroforesis gel agarosa adalah tidak adanya pita yang berpendar jika gel agarosa dilihat di bawah sinar UV.

f. Analisis Data

Analisis data pada penelitian dengan pengujian DNA genom hasil isolasi dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif dilakukan menggunakan elektroforesis pada gel agarosa dan secara kuantitatif dilakukan dengan melihat rasio A260/A280 pada alat spektrofotometer UV. Data yang diperoleh kemudian dibahas sesuai dengan acuan teori yang ada.

G. Alur Penelitian

Penjelasan mengenai prosedur penelitian dapat dilihat dalam bentuk diagram, yaitu sebagai berikut:



Gambar 3.1. Diagram Alur Penelitian

Meli, 2014

Isolasi DNA Genom Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Ciengang, Kawah Darajat dan Hydrothermal Vent Kawio

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu