

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian murni yang dilakukan dengan metode deskriptif, yaitu 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. Subjek dan Sampel Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah konsorsium bakteri yang berasal dari perairan laut dalam kawasan *hydrothermal vent* Kawio provinsi Sulawesi Utara. Sampel air laut yang digunakan diambil dari perairan *hydrothermal vent* kedalaman 1500 – 3000 m dengan tekanan 317 atm. Temperatur kawasan ini berkisar 25 – 80°C dan keadaan pH 2,8 – 6,5 dengan salinitas sekitar 35 – 40 ppt. Jenis sampelnya merupakan campuran dari air laut dengan sedikit sedimen.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian ini dimulai dari bulan Maret 2014 sampai bulan September 2014. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Penelitian Pangan, Kesehatan, Obat-obatan dan Kesehatan, gedung Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Rekayasa Genetika, gedung Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu

Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Persiapan penelitian meliputi sterilisasi alat dan bahan, pembuatan larutan stok untuk medium, isolasi genom dan elektroforesis. Medium tumbuh yang digunakan adalah medium *Luria Bertani* yang dimodifikasi. Alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan kemudian dibungkus. Setelah itu disterilisasi panas lembab dengan cara diautoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C.

2. Tahap Penelitian

a. Enrichment

Sampel air laut dalam (**Gambar 3.1.**) 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*).

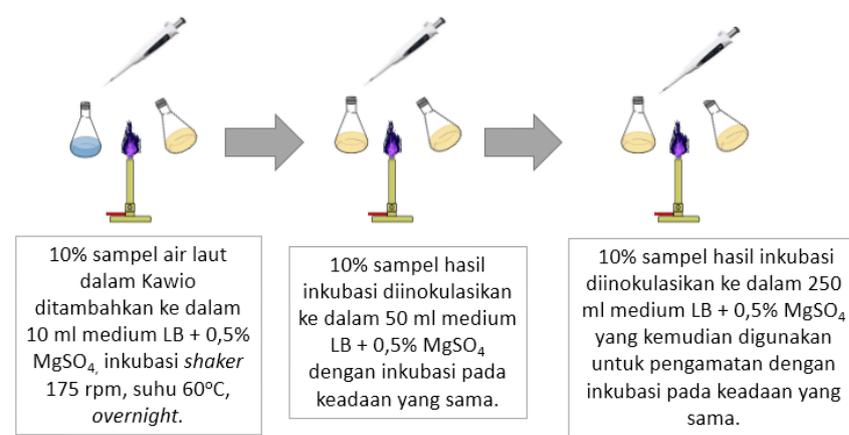


Gambar3.1. Sampel Air Laut Dalam Kawasan *Hydrothermal Vent* Kawio Sulawesi Utara

(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2014)

Pengayaan dilakukan dengan menggunakan medium *Luria Bertani* (LB) + 0,5% MgSO₄. Sebanyak 10% sampel air laut dalam Kawio ditambahkan ke dalam 10 ml medium LB. Penambahan ini dilakukan secara steril di dalam *laminar air*

flow untuk mencegah adanya kontaminasi. Kemudian diinkubasi dalam inkubator *shaker* dengan kecepatan 175 rpm dan suhu 60°C. Setelah inkubasi *overnight* atau hingga sampel terlihat keruh, sebanyak 10% sampel hasil inkubasi diinokulasikan kembali ke dalam 50 ml medium LB + 0,5% MgSO₄ dengan inkubasi pada keadaan yang sama. Baru setelah itu sampel hasil inkubasi diperbanyak dengan menginokulasikan 10% sampel ke dalam 250 ml medium LB + 0,5% MgSO₄ yang kemudian digunakan untuk pengamatan dengan inkubasi pada keadaan yang sama. Alur pengerjaan proses *enrichment* dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar3.2. Alur Cara Kerja *Enrichment*

b. Pengukuran *Optical Density* (OD)

Pengukuran 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. Analisa Kadar Biomassa

Biomassa diukur berdasarkan berat kering sel. Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang sebelumnya telah ditimbang beratnya, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet yang tersisa ditimbang untuk mengetahui berat basahnya. Setelah itu pelet dalam tabung dioven hingga kering

atau beratnya konstan. Alur pengerjaan analisis kadar biomassa dapat dilihat pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3. Alur Cara Kerja Analisis Kadar Biomassa

Berat kering sel dan berat basah sel(x) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$X \text{ (g/l)} = \frac{\text{Berat tabung berisi sel kering/basah (g)} - \text{berat tabung kosong (g)}}{\text{Volume sampel (ml)}} \times 10^3$$

d. Isolasi Genom Bakteri

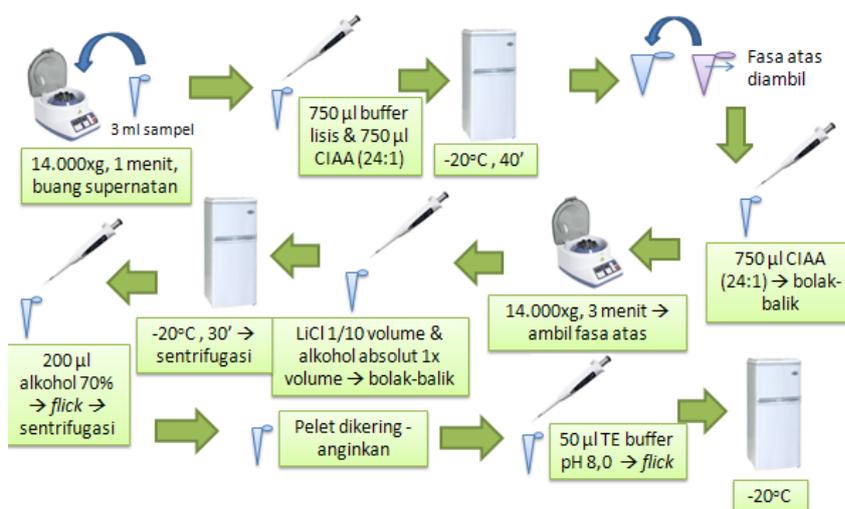
Isolasi genom bakteri ini mengacu pada metode kloroform isoamil alkohol (Sambrook *et al.*, 1989) dengan beberapa modifikasi pada beberapa langkah proses isolasi. Sampel yang digunakan merupakan hasil inkubasi yang telah diketahui waktu pertumbuhannya optimumnya.

Pertama-tama dilakukan dengan sentrifugasi sampel untuk memisahkan sel dengan medium. Sebanyak 3 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung eppendorf (masing-masing dua kali) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000xg selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga hanya pelet yang tersisa. Pelet hasil sentrifugasi ditambahkan 750 µl buffer lisis dan 750 µl kloroform : isoamil alkohol (24:1), kemudian diresuspensi menggunakan tips hingga tercampur rata. Hal ini dimaksudkan untuk melisiskan membran sel bakteri agar isi selnya keluar. Setelah homogen kemudian disimpan dalam *freezer* -20°C selama 40 menit. Setelah itu disentrifugasi 14.000xg selama 3 menit.

Setelah disentrifugasi, pada tabung terbentuk tiga lapisan, yaitu fasa atas, tengah dan bawah. Fasa atas diambil dengan menggunakan tips dan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 750 µl kloroform : isoamil alkohol. Tabung dibolak-balik pelan hingga homogen dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan

14.000xg selama 3 menit. Fasa atas diambil dan dimasukkan ke tabung baru. Ditambahkan LiCl sebanyak 1/10 volume dan alkohol absolut sebanyak 1x volume lalu tabung dibolak-balik hingga homogen, kemudian disimpan di dalam *freezer* -20°C selama 30 menit dan setelah itu disentrifugasi.

Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 14.000xg selama 3 menit, supernatan yang terbentuk dibuang hingga yang tersisa peletnya, kemudian ditambahkan 200 µl alkohol 70%. *Flick* menggunakan jari hingga homogen dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000xg selama 3 menit. Selanjutnya supernatan yang terbentuk dibuang dan peletnya dikeringkan pada suhu ruang untuk menguapkan sisa-sisa etanol. Setelah itu dilarutkan dengan menambahkan 50 µl TE buffer pH 8,0 dan *flick* hingga homogen. Disimpan pada suhu -20°C. Alur pengerjaan proses isolasi genom dapat dilihat pada **Gambar 3.4**.



Gambar 3.4. Alur Cara Kerja Isolasi Genom

e. Uji Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer. Kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$), sedangkan untuk mengukur konsentrasi DNA digunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

$\text{Å } 260$ = Nilai absorbansi pada 260 nm

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 μg untai ganda DNA per ml

f. Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil isolasi DNA genom kemudian dilakukan *running* dengan menggunakan alat elektroforesis (**Gambar 3.5.**) dengan konsentrasi gel agarosa sebanyak 0,7%. Sebelum melakukan elektroforesis, terlebih dahulu disiapkan gel agarosa untuk dicetak pada cetakan gel yang telah dipasang sisir sebagai sumur. Gel agarose yang baru dibuat atau dipanaskan didiamkan hingga hangat-hangat kuku kemudian dituangkan ke dalam cetakan. Setelah gel sudah dingin atau beku kemudian gel diletakkan pada kolom elektroforesis. Buffer TAE 1x dituangkan dalam kolom elektroforesis hingga gel 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.



Gambar 3.5. Alat untuk Elektroforesis
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2014)

Gel berisi DNA hasil *running* pada elektroforesis kemudian diambil dan direndam dalam larutan *Ethidium Bromide* (EtBr) selama 3 menit, kemudian dibilas dengan aquadest untuk membuang kelebihan EtBr. Setelah itu diamati

pada UV transilluminator (**Gambar 3.6.**). Fragmen DNA yang muncul didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.



Gambar 3.6. UV Transilluminator
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2014)

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.

g. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dimulai dengan membuat kurva pertumbuhan dari nilai *optical density* (OD) yang diperoleh dari hasil pengamatan. Laju pertumbuhan spesifik (μ) konsorsium bakteri dihitung dari data berat kering sel (g/l) yang telah diperoleh per satuan waktu pada pengamatan laju pertumbuhan konsorsium bakteri dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\mu = \ln (X_t - X_0) / (t - t_0)$$

Keterangan:

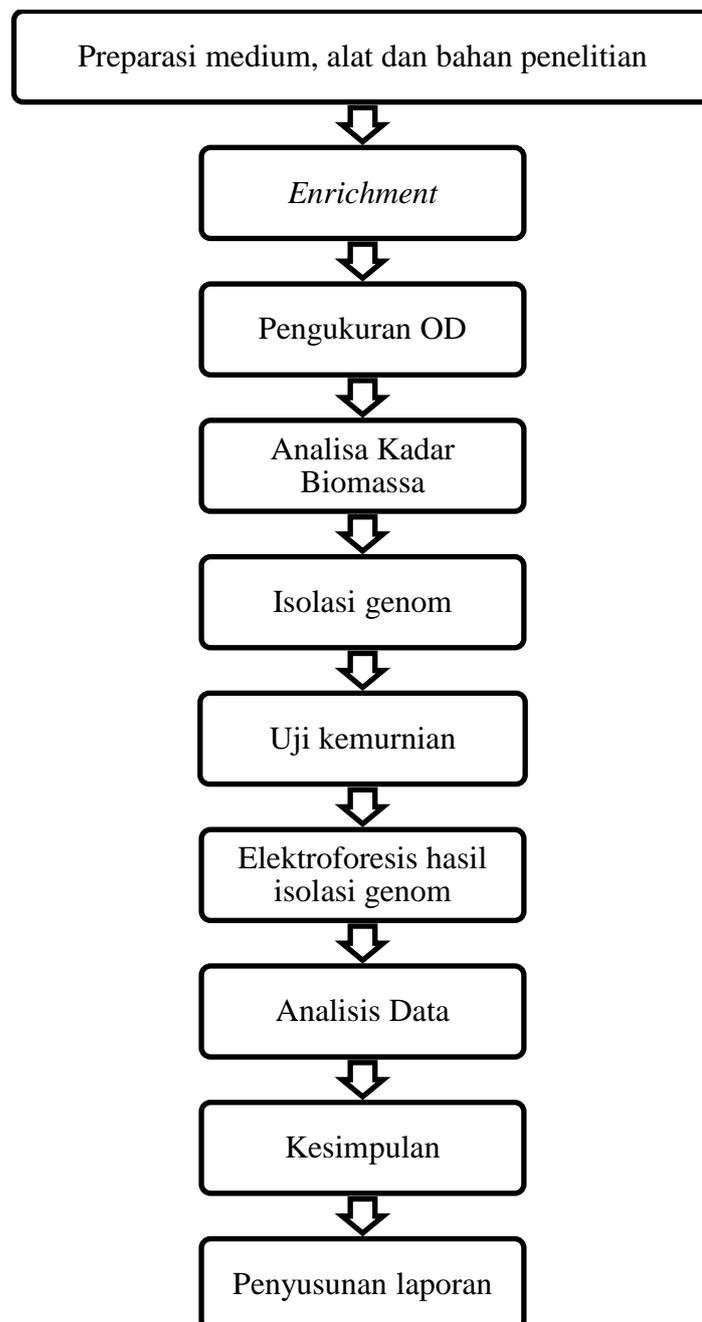
- μ = Laju pertumbuhan spesifik (jam^{-1})
- X = Konsentrasi biomassa (g/l)
- t = Waktu pertumbuhan (jam)

DNA genom hasil isolasi dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa dan secara kuantitatif dilakukan dengan melihat rasio $\text{Å}260/\text{Å}280$ pada alat spektrofotometer UV dan

menghitung konsentrasi DNA. Data yang diperoleh kemudian dibahas sesuai dengan acuan teori yang ada.

F. Alur Penelitian

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



Gambar 3.7. Diagram Alur Penelitian