

BAB III METODE

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian murni atau *pure research* 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. Populasi dan Sampel

Populasi yang diamati pada penelitian ini adalah seluruh konsorsium bakteri pada sampel air dari perairan *hydrothermal vent* Kawio, Sulawesi Utara. Sampel yang diamati pada penelitian ini adalah konsorsium bakteri dan DNA genom yang diisolasi dari perairan *hydrothermal vent* Kawio yang dapat ditumbuhkan dengan menggunakan medium campuran 25% BHMS + 75% LB pada suhu 60 °C.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan April sampai dengan September 2014. Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Antar Universitas (PAU) dan Laboratorium Genetika, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) Institute Teknologi Bandung (ITB). Penelitian juga dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).

D. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Rekayasa Genetika PAU ITB, Laboratorium SITH ITB, dan Laboratorium Mikrobiologi UPI. Daftar alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan Alat

Alat-alat yang akan digunakan selama penelitian dicuci terlebih dahulu sampai bersih dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke *autoclave* selama 15 - 20 menit pada suhu 121°C.

2. Pembuatan Medium Campuran 25% BHMS + 75% LB

Medium LB (Luria Bertani) Broth dan BHMS (Bushnell Haas Mineral salts) yang akan digunakan sebagai medium pertumbuhan konsorsium bakteri dari sampel air *hydrothermal vent* Kawio dibuat masing-masing terlebih dahulu secara terpisah. Medium LB cair disiapkan dengan menggunakan komposisi 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 10 g trypton dan ditambahkan 0,5% MgSO₄ (Restiawaty *et al.*, 2013) kemudian ditambahkan *aquades* sampai 1 liter, setelah itu diaduk sampai homogen selanjutnya *adjust* pH sampai 7,0 ± 0,2.

Untuk membuat medium BHMS cair disiapkan dengan komposisi 1 g KH₂PO₄, 0,2 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 0,02 g CaCl₂, 1 g NH₄NO₃ dan 2 tetes FeCl₃ 60% kemudian ditambahkan *aquades* sampai 1 liter (Cappello *et al.*, 2012). Selanjutnya ke dalam larutan medium BHMS ditambahkan 30 mM glukosa setelah itu, *adjust* pH sampai 7,0 ± 0,2.

Setelah kedua medium selesai dibuat secara terpisah, kemudian langkah selanjutnya adalah membuat medium campuran 25% BHMS + 75% LB. Untuk membuat medium campuran 25% BHMS + 75% LB sebanyak 300 ml, dilakukan dengan menyampurkan sebanyak 250 ml BHMS dan 750 ml LB. Selanjutnya medium campuran 25% BHMS + 75% LB disterilisasi dengan cara dimasukkan ke dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C.

3. Tahap Penelitian

a. Konsorsium Bakteri dari Perairan *hydrothermal vent* Kawio

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah konsorsium bakteri dari perairan *Hydrothermal Vent* Kawio, Sulawesi Utara. Sampel konsorsium bakteri yang digunakan yaitu berupa sampel air yang sudah tersedia di laboratorium PAU ITB yang disimpan dalam lemari es suhu 4 °C.



Gambar 3.1 Sampel Air *Hydrothermal Vent* Kawio, Sulawesi Utara

(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2014)

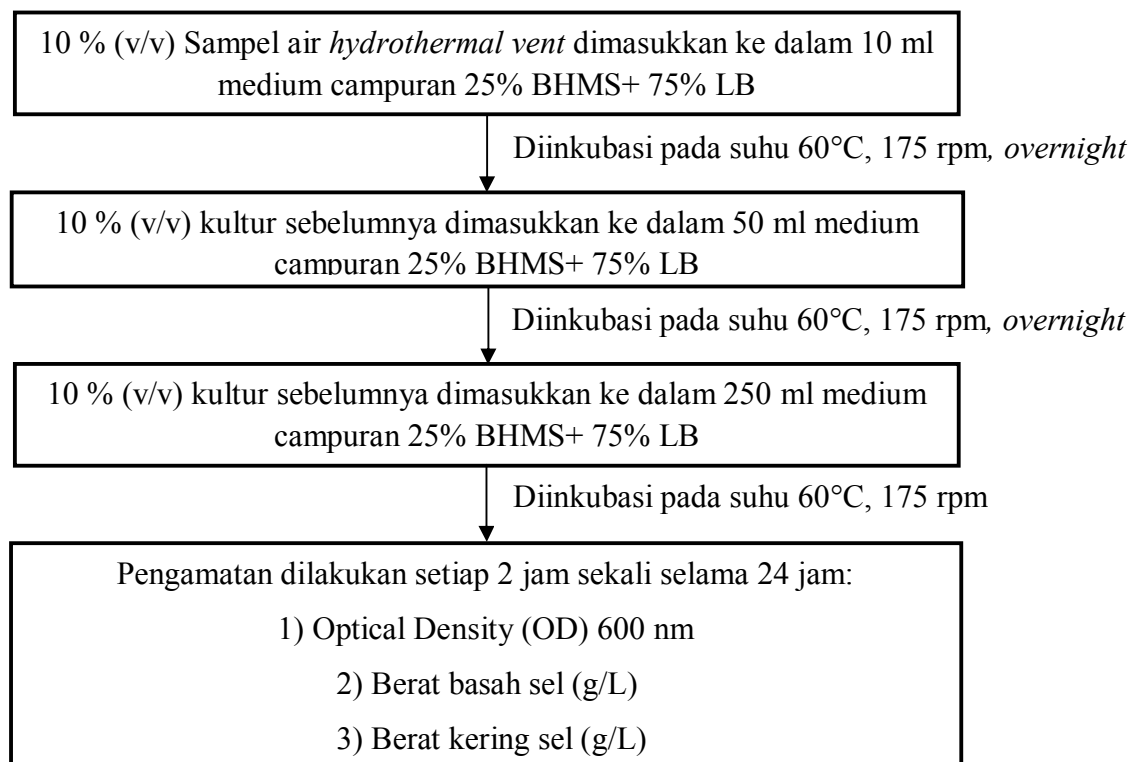
Berdasarkan data dari NOAA-BPPT pada INDEX SATAL (Dalam Restiawaty *et al.*, 2013) lokasi pengambilan sampel air di perairan *Hydrothermal vent* Kawio terletak pada 5°72' 0" Lintang Utara dan 127°14' 0" Bujur Timur, Provinsi Sulawesi Utara. Kedalaman Kawio *Hydrothermal vent* yaitu berkisar 3500–4720 m (*inner vent*) dan berkisar 1500–3000 m (*surrounding*) dengan tekanan sebesar 317 atm. Kawio *Hydrothermal vent* memiliki temperatur 250–400 °C (*inner vent*), 35–80 °C (*surrounding*), dan 2–4 °C (*deep water*). Keadaan pH di Kawio *Hydrothermal vent* sekitar 2,8–6,5 dan memiliki salinitas sekitar 35–40 ppt dengan jenis sampel berupa campuran air dan sedikit sedimen.

b. Laju Pertumbuhan Konsorsium Bakteri

Sebelum melakukan pengamatan laju pertumbuhan konsorsium bakteri dari perairan *hydrothermal vent* Kawio, terlebih dahulu dilakukan tahap *enrichment* pada sampel air. Tahap *enrichment* dilakukan dengan

memasukkan sebanyak 10 % (v/v) sampel air berisi konsorsium bakteri dari perairan *hydrothermal vent* Kawio ke dalam 10 ml medium campuran 25% BHMS+75% LB. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 60 °C dan selama inkubasi kultur diagitasi pada kecepatan 175 rpm dalam *incubator shaker* selama 18 jam. Setelah 18 jam diinkubasi, kemudian sebanyak 10% (v/v) dari hasil *enrichment* diinokulasikan kedalam 50 ml medium campuran 25% BHMS+75% LB, selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 60 °C dengan kecepatan 175 rpm pada *incubator shaker* selama 18 jam.

Selanjutnya untuk mengamati laju pertumbuhan konsorsium bakteri dari perairan *hydrothermal vent* Kawio dilakukan dengan mengambil 10% (v/v) hasil *enrichment* ke dalam 250 ml medium campuran 25% BHMS+75% LB, kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C dan diagitasi pada kecepatan 175 rpm dalam *incubator shaker*. Pengamatan dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam. Skema bagan alir pengamatan kinetika laju pertumbuhan konsorsium bakteri dari *hydrothermal vent* Kawio dapat dilihat pada Gambar 3.2 di bawah ini



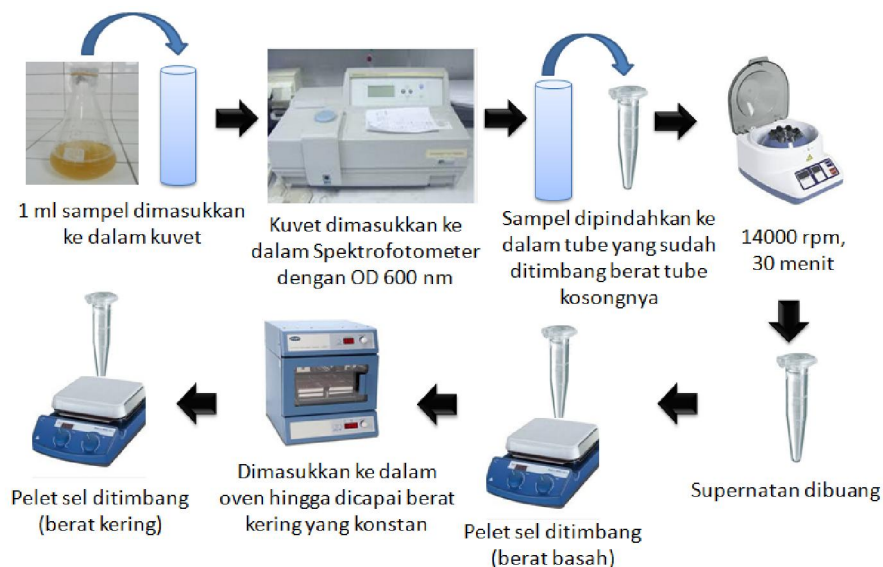
Gambar 3.2 Bagan Alir Pengamatan Kinetika Laju Pertumbuhan Konsorsium Bakteri *Hydrothermal Vent* Kawio

Rizki Ir

KINETIKA LAJU PERTUMBUHAN DAN ISOLASI GENOMIK KONSORSIUM BAKTERI DARI HYDROTHERMAL VENT KAWIO MENGGUNAKAN MEDIUM CAMPURAN 25% BHMS + 75% LB

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

Pengamatan pertumbuhan biomassa sel dilakukan dengan melihat nilai *Optical Density* (OD) 600 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV. Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung khusus kemudian dilihat OD sel-nya pada panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya 1 ml kultur yang sudah dicek OD-nya, dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang sebelumnya telah ditimbang berat tabung kosongnya. Kemudian sampel disentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 14000 rpm. Setelah disentrifugasi, supernatan yang mengandung medium kultur dibuang, setelah itu pelet sel yang dihasilkan di bagian bawah tabung mikro ditimbang (berat basah sel).



Gambar 3.3 Bagan Alir Perhitungan Biomassa Sel Konsorsium Bakteri *Hydrothermal Vent Kawio*

Untuk menghitung berat basah sel, berat yang ditimbang tersebut dikurangi dengan berat tabung mikro kosong yang digunakan. Setelah ditimbang berat basahnya selanjutnya dikeringkan di dalam oven selama 18–24 jam atau sampai diperoleh berat kering yang konstan. Cara perhitungan berat kering sel dilakukan seperti pada perhitungan berat basah sel.

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

Rizki Indah Permata Sari, 2014

KINETIKA LAJU PERTUMBUHAN DAN ISOLASI GENOMIK KONSORSIUM BAKTERI DARI HYDROTHERMAL VENT KAWIO MENGGUNAKAN MEDIUM CAMPURAN 25% BHMS + 75% LB

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

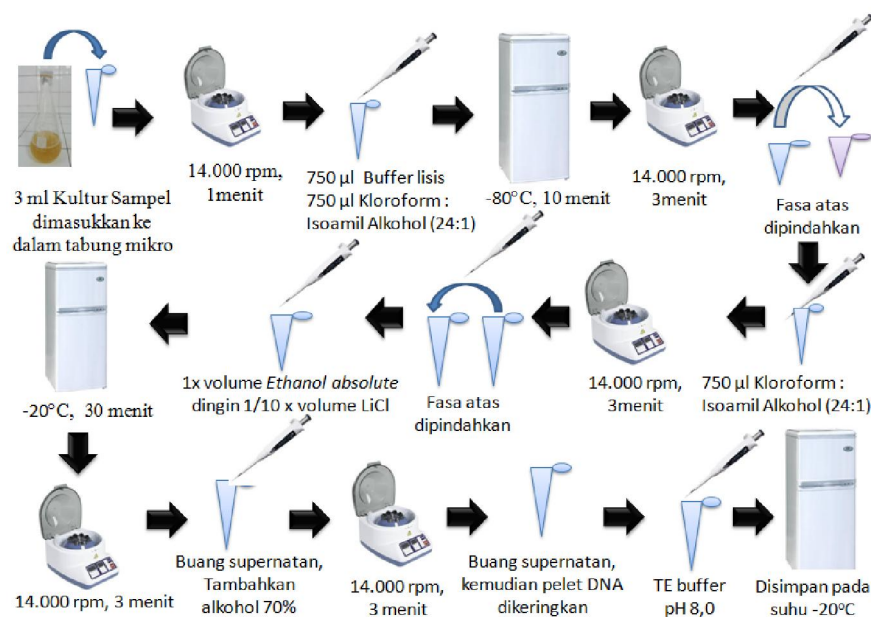
c. Isolasi DNA Total (Genom)

DNA total konsorsium bakteri diisolasi menggunakan metode Kloroform Isoamil Alkohol (CIAA) yang sudah dioptimasi (Sambrook *et al.* 1989). Sampel diperoleh dari hasil panen bakteri yang menunjukkan nilai OD 600 nm tertinggi yang dicapai pada waktu pertumbuhan optimumnya. Sebanyak 3 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung mikro (*tube*) ukuran 1,5 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit untuk memisahkan pellet dengan supernatan. Selanjutnya buang supernatan sampai tidak ada lagi medium pada tabung mikro. Kemudian ke dalam tabung mikro ditambahkan larutan buffer lisis sebanyak 750 μ l dan kloroform : isoamil alkohol (24 : 1) sebanyak 750 μ l, selanjutnya diresuspensi menggunakan tips sampai pellet homogen. Setelah pellet homogen dengan larutan buffer lisis dan kloroform : isoamil alkohol (24 : 1), tabung mikro disimpan di dalam *freezer* pada suhu -80 °C selama 10 menit. Setelah 10 menit, kemudian tabung mikro diambil dari *freezer* dan dibiarkan mencair terlebih dahulu lalu siap untuk disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Setelah disentrifugasi, akan terjadi pemisahan fasa anorganik (fasa atas) dan fasa organik (fasa bawah). Kemudian fasa atas yang terbentuk dipindahkan secara hati-hati ke dalam tabung mikro yang baru ukuran 1,5 ml.

Selanjutnya setelah fasa atas dipindahkan, ditambahkan kloroform:isoamil alkohol (24 : 1) sebanyak 750 μ l ke dalam tabung mikro setelah itu tabung mikro segera diinvert sebanyak 10 kali atau lebih. Selanjutnya tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Setelah itu akan terbentuk fasa atas, kemudian fasa atas yang terbentuk tersebut dipindahkan secara perlahan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang baru dan dihitung volume fasa atas yang diperoleh. Selanjutnya ke dalam tabung mikro ditambahkan 4M LiCl dingin (1/10x volume fasa atas) dan *ethanol absolute* dingin (1x volume fasa atas), kemudian tabung mikro diinvert kurang lebih sebanyak 10 kali. Selanjutnya tabung mikro disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20 °C selama 30 menit untuk mempercepat proses presipitasi. Setelah 30 menit disimpan

pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Setelah disentrifugasi akan terjadi pemisahan antara pellet DNA dengan supernatan. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pellet dibiarkan tetap di dalam tabung mikro.

Selanjutnya ke dalam tabung mikro ditambahkan ethanol 70% dingin sebanyak $20\text{ }\mu\text{l}$, kemudian diresuspensi menggunakan tips sampai pellet DNA larut. Setelah itu, tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Kemudian supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pellet dibiarkan tetap di dalam tabung mikro dan dibiarkan kering di udara dengan cara membuka tutup tabung mikro selama 20 - 25 menit atau sampai pellet kering. Setelah pellet kering, pellet direhidrasi dengan menambahkan $10\text{ }\mu\text{l}$ buffer TE pH 8,0 kemudian simpan pada *freezer* suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

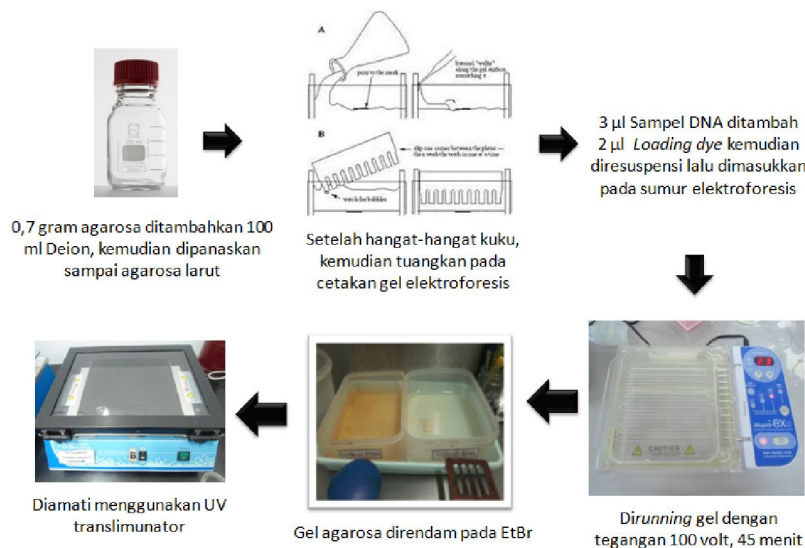


Gambar 3.4 Bagan Alir Isolasi DNA Genom Konsorsium Bakteri
Hydrothermal Vent Kawio

d. Elektroforesis Gel Agarosa

Langkah pertama dalam proses elektroforesis adalah menyiapkan cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 0,7%. Gel agarosa dibuat dengan menambahkan 0,7 gram agar kedalam 100

ml buffer TAE 1x kemudian dididihkan dengan menggunakan penangas sampai agar larut. Gel agarosa yang sudah hangat-hangat kuku dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) dan dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel agarosa dan cetakannya direndam pada buffer TAE 1x di kolom elektroforesis. Sampel DNA Genom sebanyak 3 μ l dicampur dengan 2 μ l *loading dye* pada plastik *wrap* kemudian diresuspensikan sampai homogen setelah itu dimasukkan ke setiap sumur yang telah dibentuk oleh cetakan sisir (*Comb*) selain itu pada tahap ini juga digunakan penanda DNA marker 1 kb. Sampel kemudian dilakukan *running* gel pada alat elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 45 menit. Gel berisi pita DNA hasil dari elektroforesis diwarnai dengan menggunakan etidium bromida (EtBr) selama 5 menit kemudian kelebihan pewarna EtBr dibilas menggunakan *aquades*. Gel yang sudah diwarnai kemudian diamati dengan menggunakan sinar UV (UV Transluminator). Fragmen atau pita DNA yang muncul di dokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.



Gambar 3.5 Bagan Alir Elektroforesis DNA

e. Kemurnian dan Konsentrasi DNA menggunakan Spektrofotometri

Kuantitas DNA genom hasil isolasi diukur melalui spektrofotometri sinar ultra violet dengan alat spektrofotometer UV Genesis, Thermocientific.

Rizki Indah Permata Sari, 2014

KINETIKA LAJU PERTUMBUHAN DAN ISOLASI GENOMIK KONSORSIUM BAKTERI DARI HYDROTHERMAL VENT KAWIO MENGGUNAKAN MEDIUM CAMPURAN 25% BHMS + 75% LB

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

Sampel DNA genom hasil isolasi diambil sebanyak 2 μ l dan diencerkan dengan deion sampai 50 kali pengenceran. Sampel DNA genom yang sudah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung kuvet khusus selanjutnya dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (OD 260 dan OD 280). Nilai purity DNA dilihat dari nilai rasio OD 260/ OD 280. Selanjutnya untuk nilai konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus OD260 x konstanta dsDNA (50) x faktor pengenceran. Karena pada penelitian ini digunakan pengenceran 50x maka rumusnya adalah:

$$\text{Konsentrasi DNA(}\mu\text{g/ml)} = \text{OD 260} \times 50 \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

f. Analisis Data

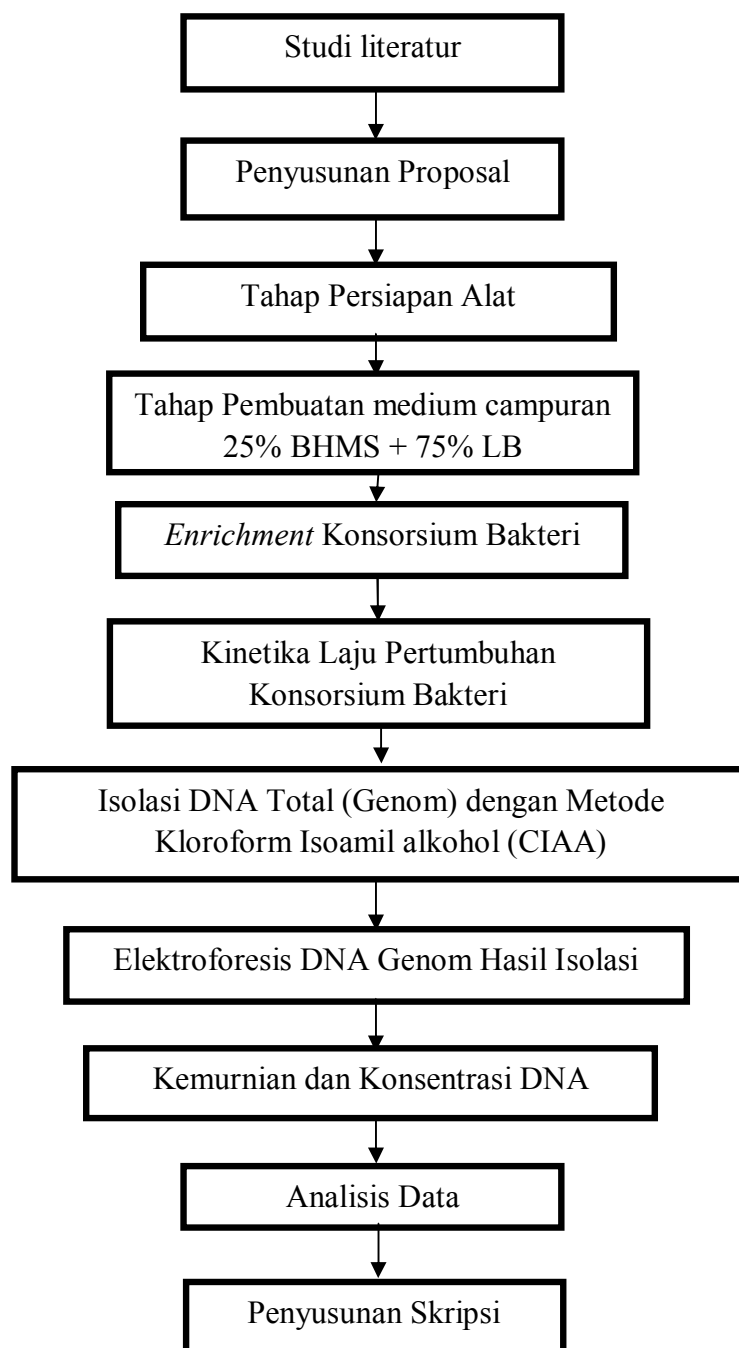
Laju pertumbuhan spesifik (μ) konsorsium bakteri dihitung dari data berat kering sel (g/l) yang telah diperoleh per satuan waktu pada pengamatan laju pertumbuhan konsorsium bakteri dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Dari nilai *optical density* (OD) 600 nm per jam yang diperoleh, dibuat kurva pertumbuhannya untuk melihat fase-fase pertumbuhan konsorsium bakteri.

DNA genom hasil isolasi dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif dilakukan menggunakan elektroforesis pada gel agarosa dan secara kuantitatif dilakukan dengan melihat rasio OD 260/ OD 280 pada alat spektrofotometer UV. Data yang diperoleh kemudian dibahas sesuai dengan acuan teori yang ada.

F. Alur Penelitian



Gambar 3.6 Alur penelitian