

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif membahas secara sistematis suatu fakta dan karakteristik pada populasi tertentu secara faktual dan akurat (Isaac & William, 1971)

B. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel pada penelitian adalah isolat biakan murni bakteri endofit akar tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. dan *Vetiveria zizanioides* L yang berjumlah sembilan buah. Sampel merupakan hasil isolasi yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Permatasari, 2011).

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Maret hingga September 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

D. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian merupakan yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi UPI. Daftar alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dijabarkan secara rinci pada Lampiran 1.

E. Langkah Kerja

1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan meliputi pembuatan medium, sterilisasi alat dan bahan, dan subkultur bakteri. Medium tumbuh yang digunakan adalah Luria Bertani (LB) agar dan LB cair yang telah disterilisasi sebelum penggunaan. Sterilisasi menggunakan alat autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

Subkultur bakteri dilakukan dalam laminar air flow dengan peralatan yang telah disterilisasi. Sembilan isolat bakteri yang diawetkan pada medium cryo ditumbuhkan pada medium LB agar steril. Setiap biakan murni diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam kulkas 4° C. Isolat bakteri ini digunakan sebagai stok dan disubkultur ke medium agar yang baru pada saat persiapan isolasi DNA.

2. Isolasi DNA Kromosom

Untuk preparasi isolasi DNA kromosom bakteri, sembilan isolat bakteri endofit ditumbuhkan selama 18 jam pada medium LB cair. Isolasi DNA dilakukan dengan metode Wilson (1997). Sebanyak 1,5 ml kultur dipindahkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi selama 2 menit pada 10.000 rpm untuk mendapatkan pelet sel bakteri. Pemisahan sel pelet bakteri dari supernatan medium terus dilakukan hingga jumlah sel mencapai $\pm 100 \mu\text{l}$. Medium lalu dibuang sampai habis, dan pelet diresuspensi pada 567 μl TE.

Pelet yang tersuspensi pada TE ditambahkan deterjen 10% SDS sebanyak 30 μl dan proteinase K sebanyak 3 μl . Campuran diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37° C. Setelah inkubasi, ditambahkan 100 μl 5 M NaCl, dan 80 μl larutan CTAB. Sampel diinkubasi pada suhu 65° C selama 10 menit supaya CTAB dapat bekerja mengikat debris protein dan polisakarida. Lalu ditambahkan larutan kloroform isoamil alkohol (24 : 1) dan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 5 menit. Fasa atas yang jernih dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru. Tabung yang mengandung supernatan lalu ditambahkan ethanol absolut dan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan DNA. Supernatan dibuang dan pelet DNA lalu dicuci dengan menggunakan ethanol 70%, disentrifugasi selama 15.000 rpm selama 5 menit. Pelet DNA lalu dikeringkan pada oven, dan diresuspensi dengan menggunakan pelarut TE sebanyak 50 μl . Selanjutnya kualitas dan kuantitas DNA diukur dengan metode spektrofotometri dan elektroforesis.

3. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan berdasarkan Sambrook & Russel (2001). Konsentrasi DNA hasil isolasi ditentukan pengukuran absorbansi DNA untuk panjang gelombang 260 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi DNA yang diperoleh menentukan volume DNA yang mesti dimasukkan pada tahap PCR. Parameter yang dihitung selain konsentrasi yaitu kemurnian DNA. Angka kemurnian DNA didapat dengan menghitung rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Berdasarkan Sambrook *et al.* (2001), rumus yang digunakan dalam menghitung kedua parameter adalah sebagai berikut :

- (i) Konsentrasi DNA = $A_{260} \times \text{faktor pengenceran} \times 50 \text{ (ng/ } \mu\text{l)}$
- (ii) Kemurnian DNA = A_{260} / A_{280}

4. Elektroforesis DNA

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan alat elektroforesis gel mini. Dalam penelitian ini elektroforesis digunakan untuk mengecek kualitas DNA kromosom dan pengecekan amplicon hasil PCR. Langkah kerja dilakukan berdasarkan Sambrook & Russel (2001) dengan konsentrasi gel berdasarkan Ayuso-Sacido dan Genilloud (2005). Proses elektroforesis dilakukan pada 1% gel agarose. Gel agarose dilarutkan dengan konsentrasi 1 % pada buffer TBE 0,5X dan dihomogenkan dengan pemanasan pada microwave. Gel agarose dalam kondisi hangat dituangkan pada cetakan yang telah dilengkapi sisir, untuk membentuk sumur elektroforesis. Gel yang telah dituang dibiarkan hingga memadat.

Cetakan gel yang telah memadat diletakkan pada kolom elektroforesis. Kolom elektroforesis telah diisi dengan buffer TBE 0,5X sehingga gel terendam dengan buffer TBE. Masing – masing sampel amplicon sebanyak 2 μl dicampurkan dengan 1 μl *loading dye* lalu dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis yang tersedia.. Sampel dielektroforesis dengan tegangan 80 volt selama 40 menit.

Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan bahan etidium bromida yang lalu dipaparkan pada sinar gelombang ultraviolet pada alat UV Transilluminator.

Gel yang berisi pita DNA direndam selama 5 menit pada ethidium bromida dengan konsentrasi 0,5 µg/ml. Gel dibilas selama 3 menit dengan menggunakan aquades untuk membersihkan kelebihan ethidium bromida. Gel diamati dibawah sinar UV, lalu didokumentasikan.

5. Amplifikasi DNA

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR. Langkah pertama yang dilakukan adalah mencampurkan bahan PCR dengan volume akhir 50 µl untuk satu reaksi. Bahan yang digunakan merupakan bagian dari kit DreamTaq Green Fermentas. Konsentrasi akhir dari setiap bahan adalah 1x Dreamtaq Green Polymerase; 0,5 µM primer forward; 0,5 µM primer reverse. Jumlah DNA yang digunakan untuk setiap sampel adalah 200 ng. Primer yang digunakan merupakan pasangan primer A7F – A3R untuk deteksi gen NRPS (Ayuso – Sacido & Genilloud, 2004).

PCR dilakukan dengan alat Mastercycler Personal Machine (Eppendorf, Jerman). Kondisi PCR yang cocok dalam mengamplifikasi gen target dengan menggunakan pasangan primer A3F – A7R dioptimasi. Kondisi optimum proses amplifikasi dengan menggunakan primer A3F – A7R yang diperoleh yaitu tahap predenaturasi awal dengan suhu 95° C selama 5 menit, tahap predenaturasi dengan suhu 95° C selama 30 detik, tahap annealing dengan suhu 51,5° C selama 1 menit, tahap elongasi suhu 72° C selama 1 menit 30 detik, tahap elongasi suhu 72° C selama 10 menit, diakhiri penurunan suhu hingga suhu penyimpanan. Tahap denaturasi, annealing, dan elongasi diprogram untuk melakukan siklus berulang sebanyak 35 kali.

6. Sikuensing DNA

Gen target yang teramplifikasi dari sampel lalu disiapkan untuk proses sikuensing. Sebanyak 40 µl masing – masing amplikon dikirimkan ke Macrogen inc. Korea untuk disikuensing dengan mesin Sequencer BigDye Applied Biosystem. Sikuensing amplikon dilakukan dari arah *forward* dan *reverse*.

7. Analisis Data Bioinformatika

Sikuen NRPS yang didapatkan setelah proses sikuensing di-*contig*. Sikuen lalu dibandingkan dengan data yang tersedia pada database bank gen pada National Center for Biotechnology Information (NCBI) untuk mendapatkan sikuen yang paling homolog dengan sikuen ampikon. Analisis homologi tersebut dilakukan dengan perangkat lunak BLASTX (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Seluruh sikuen ditranslasikan menjadi bentuk asam amino dengan pemilihan *reading frame* berdasarkan kecocokan hasil BLASTX. Beberapa sikuen gen NRPS bakteri dan sikuen gen NRPS dari fungi sebagai *outgroup* diambil dari database untuk pembuatan pohon filogenetik. Pensejajaran untuk setiap sikuen gen dilakukan dengan perangkat lunak Clustal X. Hasil pensejajaran dijadikan data untuk pembuatan pohon filogenetik dengan bantuan perangkat lunak MEGA versi 5.0. Pada penelitian ini dicari juga domain konservatif pada urutan asam amino yang diperoleh dengan menggunakan perangkat lunak CDS (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Selain itu, sikuen isolat bakteri dianalisis secara *in silico* untuk memprediksi substrat yang digunakannya dengan menggunakan program *online* NRSPredictor yang tersedia pada laman <http://www.ab-informatik.unituebingen.de/software> (Rausch *et al.*, 2005).

F. Alur penelitian

