

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif dilakukan dengan tujuan utama menggambarkan secara sistematis fakta dan karakteristik objek serta subjek yang diteliti secara tepat. Penelitian ini merupakan penelitian yang diarahkan untuk memberikan gejala-gejala dan fakta-fakta atau kejadian-kejadian secara sistematis dan akurat (Zuriah, 2007).

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri *A. hydrophila* yang diisolasi dari intestin ikan air tawar sehat yaitu ikan mas, ikan lele, ikan gurame, ikan nila dan ikan tawes yang diperoleh di pertambakan dan atau di pasar.

Sampel yang digunakan yaitu DNA bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari intestine ikan mas, lele, gurame, nila dan tawes.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan November 2012 sampai Mei 2013 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 299 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Alat dan Pembuatan Medium

Maesaroh, 2013

Analisis Filogenetika Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dari Ikan Sehat Menggunakan Gen 16s rRNA

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

Persiapan penelitian dimulai dengan pengecekan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah dimasukkan ke dalam plastik untuk dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke dalam autoclave selama 15-20 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Selain itu dipersiapkan juga medium TSA (*Trypic Soy Agar*) sebagai media tumbuh bakteri *A. hydrophila* dan medium lainnya yang berperan dalam uji biokimia *A. hydrophila* selama penelitian, seperti medium RS (Rimler Shotts), sitrat agar, SIM agar, agar darah untuk uji hemolisis, medium Voges-Proskauer, MacConkey agar, dan kaldu tryptofan dalam tes indol serta reagen-reagennya. Pembuatan medium dan larutan yang digunakan dalam penelitian ini seluruhnya terpapar dalam lampiran 2.

2. Isolasi Bakteri *A. hydrophila* dari Intestin Ikan Sehat

a. Pengambilan Sampel

Permukaan tubuh ikan dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol 70%. Kemudian ikan dibedah dengan menggunakan pisau bedah steril (SNI, 2009), intestine diambil sebagai organ target, karena organ ini merupakan tempat perkembangbiakan *A. hydrophila* sebagai *microbial flora* dan mudah dibedakan dari organ pencernaan lainnya.

b. Isolasi *A. hydrophila* pada medium RS + novobiosin 0,005 gr/10ml

Isolasi dilakukan dengan metode pengenceran. Intestin ikan sebelumnya dibilas dengan alkohol untuk mensterilkan permukaannya kemudian ditambahkan NaCl 0,85% sebanyak 5 ml dan dicacah dengan pisau bedah steril, kemudian cairan hasil pencacahan intestine ikan tersebut diencerkan sampai dengan pengenceran 10^{-4} . Diambil masing-masing 1 ml dari sampel 10^{-3} dan 10^{-4} dan ditanam dengan cara meratakannya pada seluruh permukaan medium RS + antibiotik novobiosin yang berada pada cawan petri. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Hasil positif *A. hydrophila* dapat dilihat dari

penampakkan koloni yang berwarna kuning tanpa warna hitam di tengah koloni (SNI, 2009).

c. Pemurnian Koloni

Satu koloni yang tumbuh terpisah di dalam cawan petri yang diduga *A. hydrophila* ditumbuhkan pada medium TSA miring dan diinkubasi pada suhu 28°C selama ± 18 jam. Setelah didapatkan biakan murni, isolat bakteri tersebut diidentifikasi morfologi, biokimia, dan diteruskan dengan pengujian molekuler.

3. Identifikasi *A. hydrophila* secara Morfologi dan Biokimia

Karakterisasi *A. hydrophila* secara morfologi dan biokimia ini diawali dengan pengujian-pengujian morfologi dan biokimia sesuai Standar Nasional Indonesia (SNI 7303, 2009) yaitu pewarnaan gram, uji motilitas, uji oksidase, dan uji oksidatif-fermentatif. Sedangkan satu pengujian lainnya yaitu pengujian RS digunakan secara langsung dalam menyeleksi bakteri *A. hydrophila* dalam ikan sehat. Selain itu dilakukan pula pengujian biokimia tambahan yang terdiri dari uji fermentasi laktosa pada medium MacConkey, deteksi hemolisis pada medium agar darah, uji indol, uji sitrat, dan uji Voges Proskauer. Uji-uji biokimia tambahan ini dilakukan dengan harapan dalam lebih mengkarakterisasi secara spesifik sifat dari masing-masing isolat yang didapat.

a. Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dari lemak dengan alkohol 70% dan diberi label. Aquades steril ditetaskan pada permukaan gelas objek. Kemudian isolat diambil dengan jarum ose steril, dicampur dengan aquades dan diulas merata pada permukaan gelas objek. Dilakukan fiksasi panas dengan melewati preparat di atas api beberapa kali sampai isolat terlihat kering. Selanjutnya preparat ditetesi kristal violet secara merata dan didiamkan selama satu menit. Kemudian preparat dicuci dengan air mengalir dan larutan iodine lugol ditetaskan pada preparat sampai merata, dan didiamkan selama satu menit. Preparat dicuci kembali dengan air mengalir dan selanjutnya larutan alkohol aseton ditetaskan pada preparat

Maesaroh, 2013

Analisis Filogenetika Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dari Ikan Sehat Menggunakan Gen 16s rRNA

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

sampai merata, selanjutnya didiamkan maksimal 30 detik. Preparat dicuci dengan aquades dan dikeringkan. Kemudian larutan safranin diteteskan pada preparat sampai merata dan didiamkan selama dua menit. Selanjutnya preparat dicuci kembali dengan aquades dan dikeringkan, setelah itu morfologi bakteri diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. (SNI, 2009). Hasil pewarnaan Gram ini akan menghasilkan warna ungu pada bakteri Gram positif dan warna merah pada bakteri Gram negatif. Penentuan jenis Gram ini dapat diperkuat dengan dilakukannya *KOH sring test*, KOH 3% diteteskan pada objek *glass* kemudian diambil satu ose bakteri dan diinokulasikan pada larutan KOH tersebut. Bakteri Gram negatif akan menunjukkan adanya perubahan suspensi menjadi lengket (Cappucino & Sherman, 2011).

b. Uji Motilitas

Isolat diambil dengan jarum ose lurus, dan diinokulasikan dengan menusukkan pada medium semi solid (SIM Agar) kemudian diinkubasikan pada suhu 25°C-28°C selama 18-24 jam. Reaksi positif ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar dan tidak terlihat bekas tusukan (SNI, 2009).

c. Uji Oksidasi

Kertas saring dibasahi dengan pereaksi oksidasi. Diambil satu loop isolat bakteri, kemudian digoreskan pada kertas saring yang sudah terbasahi *reagen* oksidasi. Reaksi oksidasi positif ditandai dengan munculnya warna biru keunguan pada goresan (SNI, 2009). Reaksi positif pada uji ini menunjukkan terdapatnya enzim oksidase pada bakteri tersebut yang penting dalam transfer elektron pada sistem aerobik (Cappucino & Sherman, 2011).

d. Uji Oksidatif- Fermentasi (O/F)

Isolat diambil dengan ose steril dan inokulasikan isolat bakteri tersebut kedalam tabung yang berisi medium O/F dengan cara ditusukkan. Satu tabung ditambahkan dengan parafin cair steril hingga ketinggian 1cm diatas permukaan media O/F yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri dalam

melakukan fermentasi pada kondisi anaerob. Sedangkan tabung lainnya tidak ditambahkan dengan parafin cair, hal ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengoksidasi dan bersifat aerobik (Cappucino & Sherman, 2011), kemudian inkubasi pada suhu 28⁰C selama 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna media pada kedua tabung dari hijau menjadi kuning (SNI, 2009).

e. Deteksi Hemolisis *Aeromonas hydrophila*

Sifat hemolisis *A. hydrophila* dapat dibuktikan dengan menumbuhkan bakteri tersebut pada medium agar darah. Medium agar darah ini menggunakan darah kuda dengan ditambahkan antibiotik ampisilin 0,01 gr/l. Satu koloni bakteri yang telah ditumbuhkan sebelumnya diambil dengan jarum ose steril dan dipurifikasi pada medium agar darah di cawan petri, kemudian inkubasi selama ± 24 jam pada suhu 37⁰C dan diamati zona lisis yang terbentuk (Ruoff, K. L., 1995; Acumedia, 2009).

f. Uji MacConkey

Isolat bakteri diambil 1 ose menggunakan ose steril, kemudian digoreskan diatas medium agar MacConkey dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18 jam. isolat yang dapat memfermentasi laktosa ditandai dengan warna koloni "pink rose" sedangkan bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa memiliki warna koloni yang sama dengan medium (Acumedia, 2011).

g. Uji Indol

Bakteri diinokulasi ke dalam medium kaldu Tryptone dengan jarum inokulasi steril dan inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37⁰C. Setelah diinkubasi, sampel ditetesi dengan reagen Kovac dan dibiarkan 15 menit dengan sesekali dikocok pelan. Hasil positif pada tes ini ditunjukkan dengan bereaksinya reagen kovac dengan indol dan menciptakan warna merah pada lapisan atas sampel (ASMMicrobeLibrary, 2013).

h. Uji Sitrat

Bakteri diinokulasi pada medium sitrat miring dengan jarum inokulasi steril, kemudian inkubasi selama 24-96 jam pada suhu 37⁰C dan hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari hijau menjadi warna biru dan hasil yang negatif ditunjukkan oleh warna medium yang tetap hijau (ASMMicrobeLibrary, 2013).

i. Uji Voges-Proskauer

Satu ose bakteri dimasukkan kedalam medium Voges Proskauer (V-P), kemudian inkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Selanjutnya setelah diinkubasi, ditambahkan Reagen Barritt's A (alfa-naphthol) dan Reagen Barritt B (kalium hidroksida) ke dalam sampel, kemudian tabung digoyang perlahan untuk aerasi, dan didiamkan ±15 menit dan pembentukan warna merah akan menunjukkan reaksi positif. Tidak ada perubahan warna atau warna tembaga menunjukkan hasil negatif (ASMMicrobeLibrary, 2013).

4. Karakterisasi *A. hydrophila* secara Molekuler

a. Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan menggunakan metode *boiling*. Sebanyak 1 ml PBS (*Phospat Buffer Saline*) dimasukkan ke tabung 1,5 ml steril kemudian dimasukkan satu ose kultur bakteri dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rcf selama 3 menit. Supernatan pada tabung 1,5 ml dibuang dan pada pelet yang terbentuk ditambahkan 100µl TE 1X pH 8,0 dan dihomogenkan dengan alat vortex. Setelah homogen kemudian disimpan dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 5.000 rcf dan 100 µl lisat yang diperoleh dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru dan ditambahkan TE dingin 1X sebanyak 900µl. Setelah itu disimpan pada suhu -20°C (Yanez *et al.*, 2003).

b. Identifikasi *Aeromonas hydrophila* dengan Gen Lipase (*lip*)

Deteksi gen *lip* ini menggunakan metode PCR seperti yang telah dilakukan sebelumnya dalam penelitian Cascon *et al.* (1996). Gen ini merupakan gen yang

Maesaroh, 2013

Analisis Filogenetika Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dari Ikan Sehat Menggunakan Gen 16s rRNA

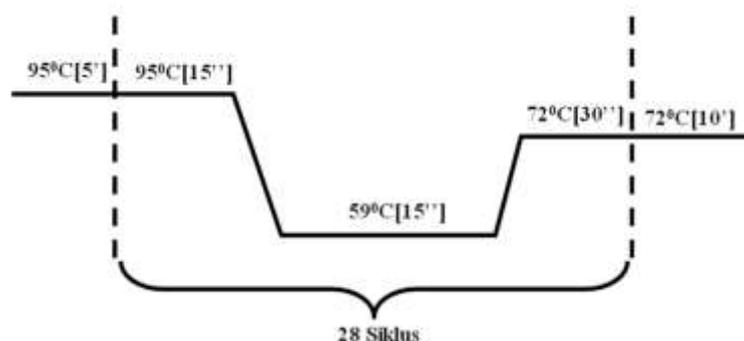
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

spesifik pada *A. hydrophila* dan amplifikasi gen ini menunjukkan pita pada ukuran 760 pb (Cascon *et al.*, 1996). Primer yang digunakan yaitu primer forward (5'-AACCTGGTTCCGCTCAAGCCGTTG-3') dan primer reverse (5'-TTGCCTCGCCTCGGCCAGCAGCT-3') (Cascon *et al.*, 1996). PCR dilakukan dengan komposisi ½ volume reaksi menurut protocol Master Mix KAPPA 2G™ Fast Ready Mix 2X. Komposisi reaksi PCR tersebut dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi reaksi amplifikasi gen lipase pada *A. hydrophila*

Bahan	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume 1x reaksi (µl)	Volume 1/2x reaksi (µl)
2X Kappa 2G fast ready mix	2x	1x	12,5	6,25
Primer forward lipase	10 µM	0,2 µM	0,5	0,25
Primer reverse lipase	10 µM	0,2 µM	0,5	0,25
Air deion steril			9,5	4,75
DNA templat			2	1
Total volume			25	12,5

Proses amplifikasi gen *lip* diawali dengan denaturasi awal pada suhu 95⁰C selama 5 menit, kemudian diikuti dengan 28 kali siklus yang tiap siklusnya terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95⁰C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 59⁰C selama 15 detik, elongasi pada suhu 72⁰C selama 30 detik, dan diakhiri dengan *final* elongasi pada suhu 72⁰C selama 10 menit. Program PCR dapat dilihat pada gambar 3.1. Hasil amplifikasi gen lipase ini akan disimpan pada suhu -20⁰C.



Gambar 3.1 Program PCR Gen Lipase

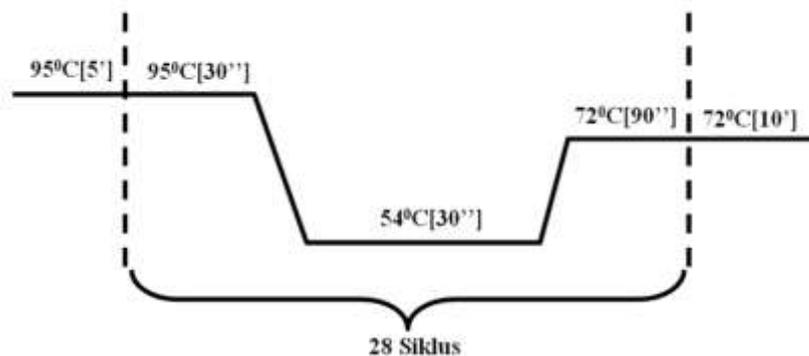
c. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Metode PCR

Proses amplifikasi gen ini dilakukan dengan metode PCR sesuai dengan yang dilakukan dalam penelitian Sahu *et al* (2012). Primer yang digunakan yaitu primer universal forward 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan primer universal reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991; Hill *et al.*, 2003). Hasil amplifikasi dari gen ini memiliki ukuran target pita 1500 pb. Amplifikasi dilakukan dengan komposisi PCR untuk 50 µl volume reaksi menurut protokol Promega, 20 µl dari hasil amplifikasi digunakan sebagai sampel untuk sikuensing. Komponen PCR yang digunakan berbeda dengan komponen PCR yang digunakan dalam mengamplifikasi gen *lip*, hal ini dikarenakan target dari amplifikasi gen memiliki ukuran lebih dari 1000 pb sehingga komponen PCR yang berasal dari Promega (Go Taq) yang cocok dalam mengamplifikasinya. Komposisi reaksi amplifikasi dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Komposisi reaksi amplifikasi gen 16S rRNA

Bahan	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume reaksi (µl)
Go taq green master mix, 2x	2x	1X	25
Primer forward universal	10 µM	0,2 µM	1
Primer reverse universal	10 µM	0,2 µM	1
Air deion steril			19
DNA template			4
Total volume			50

Proses amplifikasi diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 95⁰C selama 5 menit, kemudian diikuti dengan 28 kali siklus yang berlangsung dengan tahap denaturasi pada suhu 95⁰C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54⁰C selama 30 detik, *elongasi* pada suhu 72⁰C selama 90 detik, dan diakhiri dengan *final elongasi* pada suhu 72⁰C selama 10 menit. Program PCR dapat dilihat pada gambar 3.2. Hasil amplifikasi akan disimpan pada suhu -20⁰C.



Gambar 3.2 Program PCR Gen 16S rRNA

d. Purifikasi Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA

Purifikasi hasil PCR gen ini dilakukan menggunakan *Gel/PCR DNA fragments extraction kit* [Geneaid]. Hasil PCR dipindahkan dalam tabung 1,5 ml. *DF buffer* ditambahkan pada tabung tersebut sejumlah 5x volume sampel dan dicampurkan dengan cara alat vortex. Kemudian *DF column* disiapkan diatas tabung koleksi 2 ml dan sampel dipindahkan secara perlahan melalui *DF column* tersebut. Selanjutnya sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. DNA telah terikat pada membran dan kotoran terpisahkan dalam tabung koleksi 2 ml untuk selanjutnya dibuang dan *DF column* diletakkan kembali pada tabung koleksi yang sudah kosong. Sebanyak 600 μ l *wash buffer* ditambahkan dan diletakkan ditengah-tengah *DF column* kemudian diamkan selama 1 menit, setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik, suspensi yang tertinggal dalam tabung koleksi dibuang dan *DF column* disimpan kembali pada tabung koleksi tersebut, dan kemudian sentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan *matrix column*. *Matrix column* yang telah kering dipindahkan pada tabung 1,5 ml kemudian ditambahkan 75 μ l *elution buffer* yang ditambahkan dengan cara diteteskan pada tengah-tengah *DF column* kemudian didiamkan selama 2 menit, menunggu seluruh *elution buffer* terserap oleh matrix. Sentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 10.000 rpm dan amplicon DNA telah selesai dipurifikasi.

e. Mengukur Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Kemurnian dan konsentrasi DNA hasil amplifikasi yang telah dipurifikasi dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kemurnian DNA dapat dilihat dari perbandingan absorbansi suspensi DNA pada panjang gelombang 260 nm terhadap 280 nm. Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dapat dikonversikan menjadi konsentrasi dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA (ng/}\mu\text{l)} = \text{Nilai A}_{260} \times \text{Konstanta DNA (50)} \times \text{Faktor Pengenceran}$$

Gambar 3.3 Rumus Perhitungan Konsentrasi DNA

f. Deteksi Gen Virulen

Gen Virulen pada *A. hydrophila* dapat diamplifikasi dengan metode *touchdown* yaitu melakukan replikasi dengan suhu *annealing* yang berbeda-beda pada rentang suhu tertentu (Syadza, 2012). Terdapat tujuh gen virulen yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Act*, *AopB*, *AscV*, *Alt*, *AerA*, *Ast*, dan *AexT*. Primer yang digunakan dalam amplifikasi dapat dilihat pada tabel 3.3. Komposisi PCR yang digunakan adalah ½ reaksi menurut protokol Mix KAPPA 2G™. Komposisi reaksi amplifikasi dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.4.

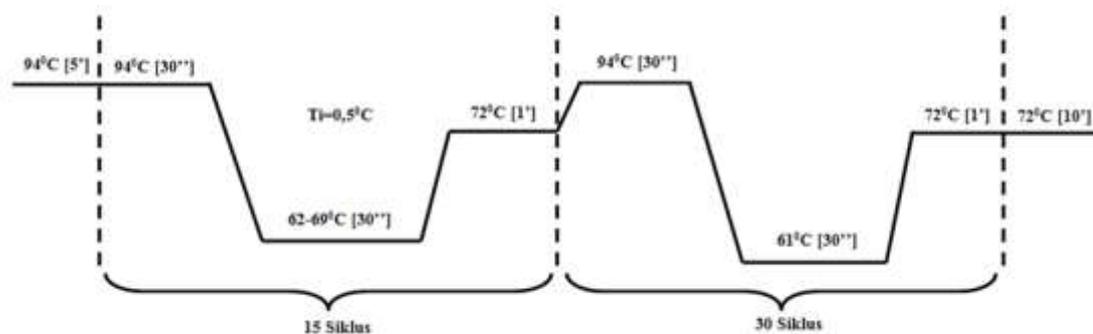
Tabel 3.3 Primer Gen Virulen yang Digunakan dalam Penelitian

Primer	Sikuen (5' - 3')	Pustaka
<i>ActF</i> <i>ActR</i>	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCTTGA ACT	Kingombe <i>et al.</i> , 2010
<i>AopBF</i> <i>AopBR</i>	TACCTGTTGGAATGATTCCG AGTGAACGCCCTCTCTCC	Kingombe <i>et al.</i> , 2010
<i>AscVF</i> <i>AscVR</i>	AGCAGATGAGTATCGACGG AGGCATTCTCCTGTACCAG	Kingombe <i>et al.</i> , 2010
<i>AltF</i> <i>AltR</i>	TGCTGGGCCTGCGTCTGGCGGT AGGAACTCGTTGACGAAGCAGG	Li <i>et al.</i> , 2011
<i>AerAF</i> <i>AerAR</i>	AACCGAACTCTCCAT CGCCTTGTCCTCGTA	Carvalho-Castro <i>et al.</i> , 2010
<i>AstF</i> <i>AstR</i>	GACTTCAATCGCTTCTCAACG GCATCGAAGTCACTGGTGAAGC	Vilches <i>et al.</i> , 2004
<i>AexTF</i> <i>AexTR</i>	CGTGGCCATCAAAGAGTGG GCAGCTGGCTCATCGCCTC	Vilches <i>et al.</i> , 2004

Tabel 3.4 Komposisi Reaksi Amplifikasi Gen Virulen pada *A. hydrophila*

Bahan	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume 1x reaksi (µl)	Volume 1/2x reaksi (µl)
Kappa buffer	5x	1x	5	2,5
MgCl ₂	25 mM	1,75 mM	1,75	0,875
dNTPs mix	10 mM	0,3 mM	0,75	0,375
Primer Forward	10 mM	0,5 mM	1,25	0,625
Primer Reverse	10 mM	0,5 mM	1,25	0,625
Kappa taq			0,25	0,125
DNA template			1	1
Air deion steril			13,75	6,375
Total volume			25	12,5

Proses amplifikasi gen virulen dilakukan dengan metode *touchdown* PCR. Untuk gen *alt* proses amplifikasi diawali dengan proses denaturasi awal pada suhu 94⁰C selama 5 menit diikuti dengan 15 siklus berlangsung dengan tahap denaturasi pada suhu 94⁰C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 62⁰C–69⁰C selama 30 detik dengan *temperature increment* -0,5⁰C, elongasi pada suhu 72⁰C selama 1 menit. Selanjutnya, diawali dengan 30 siklus yang diawali dengan proses denaturasi pada suhu 94⁰C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 61⁰C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72⁰C selama 1 menit. Kemudian, diakhiri dengan *final* elongasi pada suhu 72⁰C selama 10 menit.

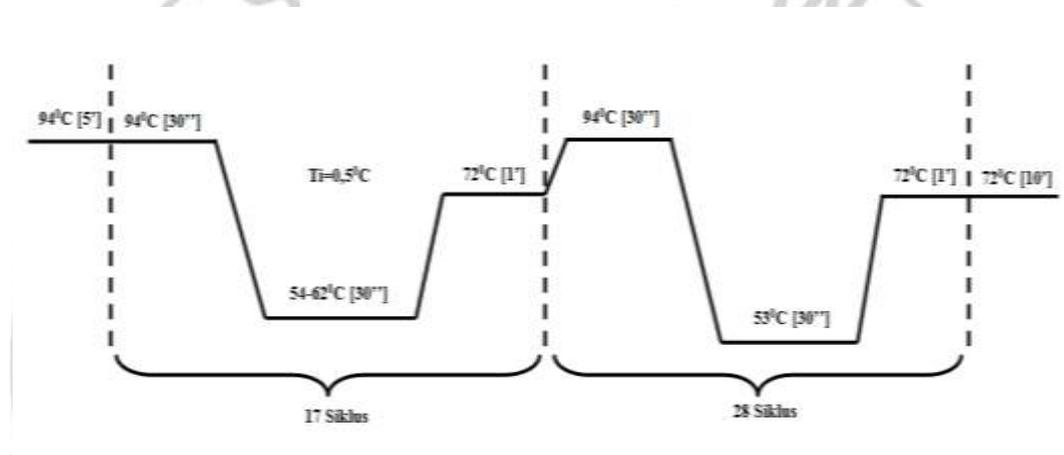
Gambar 3.4 Program PCR *touchdown* gen virulen *alt* (Wulandari, 2012)

Maesaroh, 2013

Analisis Filogenetika Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dari Ikan Sehat Menggunakan Gen 16s rRNA

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

Sedangkan untuk keenam gen virulen lainnya, yaitu *act*, *aopB*, *aerA*, *ascV*, *aexT*, dan *ast*, PCR dilakukan dengan program suhu awal denaturasi 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 17 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* 54°C-62°C selama 30 detik dengan *temperature increment* -0,5°C, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Selanjutnya, diawali dengan 28 siklus yang diawali dengan proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 53°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Kemudian, diakhiri dengan *final elongasi* pada suhu 72°C selama 10 menit.



Gambar 3.5 Program PCR *touchdown* gen virulen *act*, *aopB*, *aerA*, *ascV*, *aexT*, dan *ast* (Wulandari, 2012 dan Syadza, 2012).

g. Elektroforesis Hasil PCR Gen Lipase, Gen 16S rRNA, dan Gen Virulen

Gel agarosa 1,5% dalam 0,5x TBE untuk elektroforesis gen lipase dan gen 16S Rrna serta 1,4% dalam 0,5x TBE untuk elektroforesis hasil amplifikasi gen virulen dibuat terlebih dahulu sebelum memulai tahapan elektroforesis. Larutan dididihkan hingga agarosa larut sempurna. Baki gel agarosa disiapkan dan sisir elektroforesis dipasang disalah satu ujung baki. Larutan agarosa dihomogenkan, kemudian dituangkan kedalam baki gel agarosa. Larutan dibiarkan hingga berubah menjadi gel yang padat. Selanjutnya diambil 3 µl DNA, kemudian campur dengan 1 µl "loading dye" dan dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa. Elektroforesis untuk gen lipase dan 16S rRna dilakukan selama 30 menit

pada tegangan 100 volt dengan buffer 0,5x TBE (0,04 M Tris-asetat dan 0,001 M EDTA) sebagai *running buffer*, sedangkan untuk gen virulen dielektroforesis selama 20 menit pada tegangan 100 volt.

Hasil elektroforesis diwarnai dengan merendam gel agarosa dalam larutan ethidium bromide selama 3 menit. Kemudian gel dicuci dengan air deion steril selama 5 menit. Selanjutnya hasil elektroforesis yang sudah terwarnai diamati dengan alat UV transluminator dan didokumentasikan menggunakan kamera digital Canon tipe Ixus dengan modus hitam-putih.

5. Cryoreservasi

Bakteri *A. hydrophila* yang didapat dari intestin ikan nila, mas, tawes, gurame, dan lele dimasukkan ke dalam *cryo buffer*. Satu loop inokulasi penuh berisi isolat bakteri dimasukkan dalam tabung 1,5 ml yang berisikan 600 µl *Cryo buffer*, kemudian disimpan pada suhu -20°C .

6. Sikuensing

Proses sikuensing DNA dilakukan dengan menggunakan mesin sikuencer BigDye Applied Biosystem model 3730 yang dilakukan di Macrogen inc., Korea.

7. Analisis Data Bioinformatika

Isolat bakteri *A. hydrophila* yang didapatkan dari ikan tidak terinfeksi diidentifikasi sampai tingkat taksa spesies melalui analisis sekuen gen 16S rRNA dengan menggunakan metode bioinformatika (BLAST) secara online. Setiap sikuen gen *A. hydrophila* yang didapat dari proses sikuensing disejajarkan dan dibandingkan dengan data sikuen gen *Aeromonas* lainnya yang terdapat pada database Bank Gen NCBI (National Center for Biotechnology Information) di alamat website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>. Proses *alignment* dari setiap sikuen nukleotida gen *Aeromonas* menggunakan program tool *multiple-sequence alignment* dari software Clustal X dan software MEGA (version 5) untuk menganalisis filogenetika bakteri *A. hydrophila* tersebut melalui pohon filogenetika yang dihasilkan.

Maesaroh, 2013

Analisis Filogenetika Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dari Ikan Sehat Menggunakan Gen 16s rRNA

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

F. Alur Penelitian

