

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif merupakan penelitian yang bertujuan 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 digunakan dalam penelitian adalah isolat bakteri *Aeromonas spp.* yang diisolasi dari air kolam Indramayu (AKI), air kolam Indramayu Sukamelang (AKIS), air kolam Indramayu Anjatan (AKIA), air kolam Kab. Bandung (AKC), air kolam Kota Bandung (AKB), air kolam Garut (AKG), dan air kolam Tasikmalaya (AKT).

Sampel yang digunakan adalah DNA dari isolat *Aeromonas spp.* yang didapatkan.

C. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dimulai pada bulan November 2013 sampai dengan Mei 2013 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.299 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan terdapat di Laboratorium Mikrobiologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Media Tumbuh Bakteri *Aeromonas spp.*

Alat-alat kaca dan alat lain yang akan digunakan untuk pembuatan medium dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan, lalu alat-alat tersebut disterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan kedalam autoclave selama 15-20 menit pada suhu 121° C pada tekanan 1 atm. Medium yang digunakan adalah medium *Rimler Shotts (RS) Tryptic Soy Agar (TSA)*, *Blood agar*, *Mac's Conkey agar*, medium *Voges-Proskauer (VP)*, *SIM Agar*, dan medium lain yang digunakan untuk uji biokimia. Komposisi dan cara pembuatan medium dapat dilihat pada lampiran 3.

2. Tahap Penelitian

a. Isolasi Bakteri *Aeromonas*

Air dari berbagai kota diambil dengan menggunakan botol steril, kemudian isolasi bakteri *Aeromonas spp.* dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran dengan konsentrasi 10^{-1} dan 10^{-2} . Satu ml sampel air hasil pengenceran diambil lalu ditanam dengan cara ditetaskan ke dalam medium RS + novobiosin, kemudian dihomogenkan (diratakan) dengan menggunakan batang L sampai terasa kesat. Lalu kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil positif dapat dilihat dari penampakan koloni yang berwarna kuning tanpa warna hitam di tengah koloni (SNI, 2009).

b. Pemurnian dan Perbanyak Koloni Bakteri *Aeromonas spp.*

Koloni terpilih yang tumbuh pada medium RS+novobiosin diperbanyak dan dilakukan biakan murni. Satu koloni bakteri ditanam pada medium TSA miring lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 18-24 jam. Biakan murni tersebut kemudian diidentifikasi secara morfologi, biokimia, dan molekuler.

c. Identifikasi Bakteri *Aeromonas spp.*

Identifikasi bakteri isolat air kolam dilakukan secara morfologi dan Biokimia mengacu pada pedoman SNI (2009). Sedangkan identifikasi bakteri secara

Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas Spp.* Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

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

molekuler dengan menggunakan gen *lipase* yang merupakan spesifik *Aeromonas hydrophila* yang mengacu pada Lee *et al.* (2000) dan Cascon *et al.* (1996) serta menggunakan gen *16S rRNA* sebagai sikuen penanda dalam identifikasi bakteri *Aeromonas spp.*, serta deteksi gen virulen pada isolat *Aeromonas spp.*

d. Identifikasi Bakteri secara Morfologi dan Biokimia

Identifikasi bakteri secara morfologi dan biokimia berdasarkan SNI (2009) yang meliputi uji RS+novobiosin, uji motilitas, uji oksidasi, uji oksidatif-fermentatif (OF), dan uji gram. Untuk uji morfologi ditambahkan uji KOH untuk memperkuat hasil uji (Cappucino & Sherman, 2011). Lima uji biokimia ditambahkan untuk memperkuat identifikasi bakteri yang meliputi uji fermentasi laktosa (Al-Fatlawy & Al-Ammar, 2013), uji indol, uji VP, uji sitrat, (Abbot *et al.*, 2003) serta deteksi hemolisis.

1) Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dari lemak dengan alkohol 70% dan diberi label. Akuades ditetaskan pada permukaan gelas objek. Kemudian isolat bakteri diambil dengan jarum ose steril, kemudian isolat dicampur dengan akuades dan diulas merata pada permukaan gelas objek. Selanjutnya dilakukan fiksasi panas dengan cara melewatkan preparat di atas api. Sediaan mikroskopik yang sudah kering ditetesi dengan kristal violet secara merata dan didiamkan selama satu menit. Kemudian larutan lugol ditetaskan pada preparat sampai merata dan didiamkan maksimal 30 detik. Selanjutnya preparat di cuci dengan akuades dan dikeringkan. Kemudian larutan safranin ditetaskan pada preparat sampai merata dan didiamkan selama dua menit. Selanjutnya preparat dicuci kembali dengan akuades dan dikeringkan (Cappucino & Sherman, 2011). Bentuk sel diamati menggunakan mikroskop compound Nikon eclipse 50i. Isolat bakteri yang termasuk Gram (+) ditunjukkan dengan sel bakteri berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram (-) sel bakteri berwarna merah.

2) Uji KOH

Uji KOH dilakukan untuk memperkuat penentuan jenis gram pada bakteri. satu tetes KOH 3% diteteskan pada gelas objek, kemudian satu ose isolat bakteri diambil dan disuspensikan dengan KOH 3%. Dengan bantuan jarum ose suspensi tersebut ditarik, apabila suspensi tersebut kental (seperti lendir) menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif, sedangkan apabila suspensi tersebut encer maka bakteri yang diuji merupakan bakteri gram positif (Arthi *et al.*, 2003).

3) Uji Motilitas

Isolat bakteri diambil dengan jarum ose lurus, kemudian isolat bakteri diinokulasikan dengan cara ditusukkan tegak lurus satu kali pada medium semi solid (SIM Agar) lalu diinkubasikan pada suhu 25°C-28°C selama 18-24 jam. (Cappucino & Sherman, 2011). Bakteri yang bersifat motil akan tumbuh menyebar tidak hanya pada daerah tusukan (SNI, 2009).

4) Uji Oksidasi

Kertas saring dibasahi dengan pereaksi oksidasi, lalu isolat bakteri diambil satu ose, selanjutnya isolat bakteri digoreskan pada kertas saring tersebut. Reaksi oksidasi positif ditandai dengan munculnya warna biru keunguan pada goresan (SNI, 2009).

5) Uji Oksidatif-fermentasi (O/F)

Sebanyak dua tabung yang berisi lima ml medium OF disiapkan. Satu ose isolat bakteri diambil dan diinokulasikan pada medium O/F. Satu tabung ditambahkan dengan paraffin cair steril hingga ketinggian 1cm diatas permukaan medium, sedangkan tabung lainnya tanpa paraffin cair. Kemudian kultur diinkubasikan pada suhu 25°C-28°C selama 18-24 jam. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna media pada tabung yang diisi paraffin cair dari hijau menjadi kuning (SNI,2009).

Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

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

6) Deteksi Hemolisis

Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium TSA yang telah ditambahkan darah kuda 5% dan ampicillin 1% (medium *blood agar*). Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati zona lisisnya (Monfort & Beleux, 1991)

7) Uji Sitrat

Isolat bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose lalu isolat tersebut diinokulasikan pada medium *simmon's citrate* miring, selanjutnya kultur diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru (Cappucino & Sherman, 2011).

8) Uji Voges-Proskauer (VP)

Satu ose isolat bakteri diinokulasikan kedalam medium kaldu VP, kemudian kultur diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, lima tetes reagen Barritt A (Alfa-naphtol) dan lima tetes reagen Barritt B (Kalium hidroksida) ditambahkan ke dalam medium, selanjutnya tabung reaksi digoyang perlahan. Hasil positif menunjukkan perubahan warna medium dari bening menjadi merah (Cappucino & Sherman, 2011).

9) Uji Indol

Isolat bakteri diambil dengan jarum ose, kemudian isolat diinokulasikan ke dalam medium kaldu Tryptone kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, medium yang telah diinokulasi ditambahkan 5 tetes reagen Kovac's. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah di ujung atas medium (Cappucino & Sherman, 2011).

10) Uji Fermentasi Laktosa

Uji fermentasi laktosa dilakukan dengan menggunakan medium *Mc Conkey*. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium dengan teknik purifikasi,

Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

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

kemudian kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni bakteri berwarna merah keunguan merupakan tanda bakteri positif memfermentasi laktosa (Cappucino & Sherman, 2011).

e. Identifikasi Bakteri *Aeromonas spp.* Secara Molekuler

Identifikasi bakteri secara molekuler meliputi isolasi DNA, deteksi gen *lipase* yang mengacu pada Cascon *et al.* (1996), deteksi kelimpahan gen virulen berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kingombe *et al.* (2010), Syadza (2012), dan Wulandari (2012). Identifikasi Bakteri *Aeromonas spp.* dengan metode sikuensing menggunakan gen *16S rRNA* (Lane, 1991 dalam Hill *et al.*, 2003)

1) Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA bakteri menggunakan teknik *boiling* (pendidihan). Sebanyak satu loop penuh bakteri dari TSA dimasukkan ke dalam tabung *mikrosentrifuge* 1.5 ml yang berisi 1 ml Posfat Buffer Saline (PBS 1x), kemudian tabung 1.5 ml tersebut disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 5000 rcf. Selanjutnya supernatan dibuang, Kemudian TE 1x 100 µl ditambahkan pada pelet bakteri dalam tabung 1.5 ml dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Setelah dihomogenkan, tabung 1.5 ml disimpan di dalam air mendidih pada suhu 100° C selama 10 menit. Sebanyak 100 µl lisat dipindahkan ke tabung *mikrosentrifuge* 1.5 ml yang baru. Selanjutnya lisat tersebut ditambahkan dengan 900 µl TE 1x yang sebelumnya disimpan di kulkas, kemudian hasil isolasi DNA disimpan pada suhu – 20° C (modifikasi Yanez *et al.*, 2003).

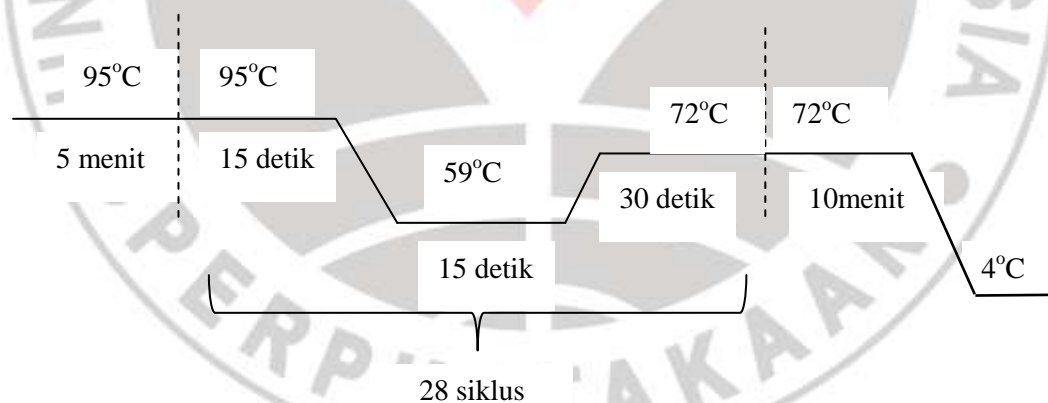
2) Identifikasi Gen Spesifik Dengan Metode PCR

Gen spesifik yang dipakai adalah gen *Lipase*. Amplifikasi DNA menggunakan alat PCR dilakukan dengan total volume reaksi 12.5 µl atau ½ reaksi menurut protokol merk Master Mix KAPPA 2G™ Fast Ready Mix 2x. Komposisi reaksi PCR dapat dilihat pada tabel 3.1

Campuran reaksi amplifikasi DNA dimasukkan ke dalam alat PCR dengan program suhu pra denaturasi 95°C 5 menit, denaturasi 95°C selama 15 detik, *annealing* 59°C selama 15 detik, elongasi 72°C 30 detik dan final elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit dengan 28 siklus. Hasil amplifikasi kemudian disimpan pada suhu -20°C. Program PCR dapat dilihat pada gambar 3.1

Tabel 3.1 Komposisi Reaksi Amplifikasi Gen *Lipase*

Bahan	Konsentrasi Awal	Konsentrasi akhir	Volum Reaksi (µl)
2x Kappa 2G Fast Ready mix	2 x	1x	6.25
Primer <i>Forward Lipase</i>	10 mM	0.5 mM	0.625
Primer <i>Rivese Lipase</i>	10 mM	0.5 Mm	0.625
Air Deion steril			4
DNA Templat			1
Total Volum			12.5



Gambar 3.1 Program Suhu PCR yang Digunakan dalam Proses Amplifikasi Gen *Lipase*

Hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis pada gel agaros. Pertama-tama cetakan gel elektroforesis disiapkan, kemudian gel agaros dibuat dengan konsentrasi 1.5 % dalam buffer TBE 0.5x, kemudian campuran gel agaros dan buffer TBE 0.5x dididihkan dengan *microwave* hingga campuran terlihat bening.

Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

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

Campuran tersebut dibiarkan hingga suhunya hangat (50-60°C). Selanjutnya gel agaros dituangkan pada cetakan yang sudah dipasang sisir dengan posisi tegak dan berjarak 0.3-0.5 mm dari ujung cetakan untuk tempat aplikasi sampel. Setelah gel dibiarkan mengeras, sebanyak 5µl DNA amplikon dicampur dengan 1 µl *loading dye*, kemudian sampel dimasukkan kedalam sumur yang terdapat dalam gel. DNA marker yang digunakan adalah DNA *Ladder* 100 pasang basa (pb) sebanyak 2µl ditambah dengan 1µl deion. Selanjutnya gel dimasukkan kedalam buffer TBE 0.5x sebagai *running buffer*. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada tegangan 100 volt. Hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan Ethium bromide selama 5 menit, kemudian gel dicuci dengan akuades selama 7 menit. Hasil elektroforesis dilihat dengan alat sinar UV dan difoto dengan menggunakan kamera digital merk Cannon.

3) Deteksi Gen Virulen

Deteksi gen virulen dilakukan dengan proses amplifikasi DNA bakteri menggunakan alat PCR. Gen virulen yang diamplifikasi sebanyak tujuh gen yaitu gen *act*, *alt*, *ast*, *aerA*, *aopB*, *ascV*, dan gen *aexT*. Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi dapat dilihat pada tabel 3.2 Komposisi PCR yang digunakan untuk total volum 12.5µl (1/4x reaksi) menggunakan KAPATaq Extra Kit. Komposisi yang digunakan dapat dilihat pada tabel 3.3.

Tabel 3.2. Sikuen Primer Gen Virulen yang Digunakan

No	Gen	Primer 5'→3'	Pustaka
1.	<i>Act</i>	F : GAG AAG GTG ACC ACC AAG AAC A R: AAC TGA CAT CGG CCT TGA ACT	Kingombe <i>et al.</i> , 2010
2.	<i>Alt</i>	F : TGC TGG GCC TGC GTC TGG CGG T R: AGG AAC TCG TTG ACG AAG CAG G	Kingombe <i>et al.</i> , 2010
3.	<i>Ast</i>	F: GAC TTC AAT CGC TTC CTC AAC G R: CGA TCG AAG TCA CTG GTG AAG C	Kingombe <i>et al.</i> , 2010
4.	<i>aerA</i>	F: AAC CGA ACT CTC CAT R: CGC CTT GTC CTC GTA	Li <i>et al.</i> , 2011
5.	<i>aopB</i>	F: TAC CTG TTG GAA TGA TTC CG R: AGT GAA CGC CCT CTC TCC	Carvalho-Castro <i>et al.</i> , 2010
6.	<i>ascV</i>	F: AGC AGA TGA GTA TCG AGC G R: AGG CAT TCT CCT GTA CCA	Vilches <i>et al.</i> , 2004
7.	<i>aexT</i>	F: CGT GGC CAT CAA AGA GTG G R: GCA GCT GGC TCA TCG CCT C	Vilches <i>et al.</i> , 2004

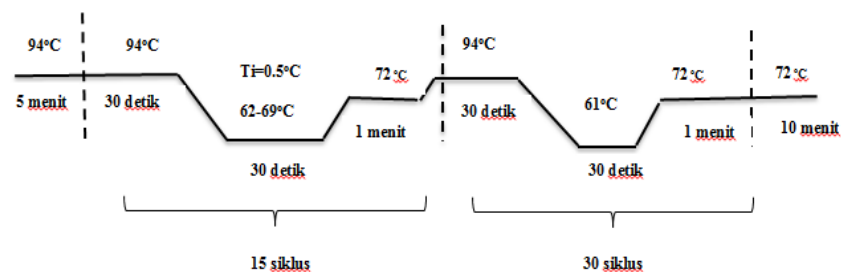
Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

Proses amplifikasi dilakukan dengan metode *Touch-down* (modifikasi Wulandari dan Syadza, 2012). Untuk primer *alt* dengan total 45 siklus, proses amplifikasi diawali dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti 15 siklus yang terdiri dari proses denaturasi pada 94°C selama 30 detik, kemudian *annealing* pada suhu 62-69°C dengan *temperature increment* (Ti) - 0.5°C, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari proses denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 61 °C, elongasi pada suhu 72 °C, dan diakhiri dengan elongasi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. Program amplifikasi dapat dilihat pada gambar 3.2.

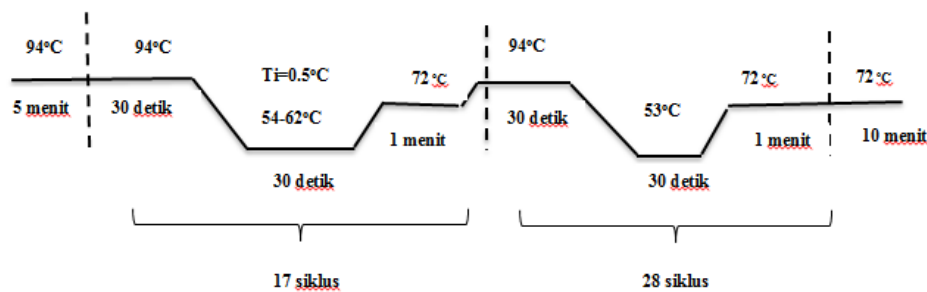
Tabel 3.3. Komposisi Reaksi Amplifikasi Gen Virulen

Bahan	Konsentrasi Awal	Konsentrasi Akhir	Volume (µl)
KAPATaq Extra buffer (tanpa Mg ²⁺)	5x	1x	2.5
MgCl ₂	25 mM	1.75 mM	0.875
dNTP mix	10 mM	0.3 mM	0.375
Forward Primer	10 mM	0.5 mM	0.625
Reverse Primer	10 mM	0.5 mM	0.625
KAPATAq Extra Hotstar DNA Polymerase	2.5 U/µl	1.25 U	0.125
Air Deion Steril			6.375
DNA Templat			1
Total Volume			12.5



Gambar 3.2. Program suhu PCR yang digunakan untuk amplifikasi Gen *alt*

Untuk primer *act*, *ast*, *aopB*, *aerA*, *ascV*, dan *aexT*, proses amplifikasi dengan total 45 siklus diawali dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti 17 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 62-54°C, *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian dilanjutkan dengan 28 siklus berikutnya yang terdiri dari proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 53°C, *elongasi* pada suhu 72°C dan diakhiri dengan *elongasi* akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Program amplifikasi dapat dilihat pada gambar 3.3



Gambar 3.3. Program suhu PCR yang digunakan untuk amplifikasi Gen Virulen *act*, *ast*, *aopB*, *aerA*, *ascV*, dan *aexT*

Hasil PCR kemudian diamati dengan elektroforesis gel agarosa 1.4 %. Sebanyak 3 µl DNA ampikon dicampur dengan 1µl *loading dye*. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam sumur. DNA marker yang digunakan adalah *FastRuler DNA Ladder Middle range ready-to-use*. Sebanyak 2µl DNA marker dicampur dengan deion 1µl. Elektroforesis dilakukan selama 20 menit pada tegangan 100 volt dengan buffer TBE 1x sebagai *running buffer*. Hasil elektroforesis dilihat dengan alat sinar UV dan difoto dengan menggunakan kamera digital merk Cannon.

4) Pra sikuensing

a. Identifikasi Gen *16S rRNA* Dengan Metode PCR

Proses amplifikasi gen *16S rRNA* dilakukan dengan menggunakan alat PCR. Komposisi yang digunakan menurut protokol *Gotaq Green Master Mix 2x/ KAPA Fast Ready Mix* yaitu dengan total volum 50µl, yang berisi *KAPA/GoTaq Master*

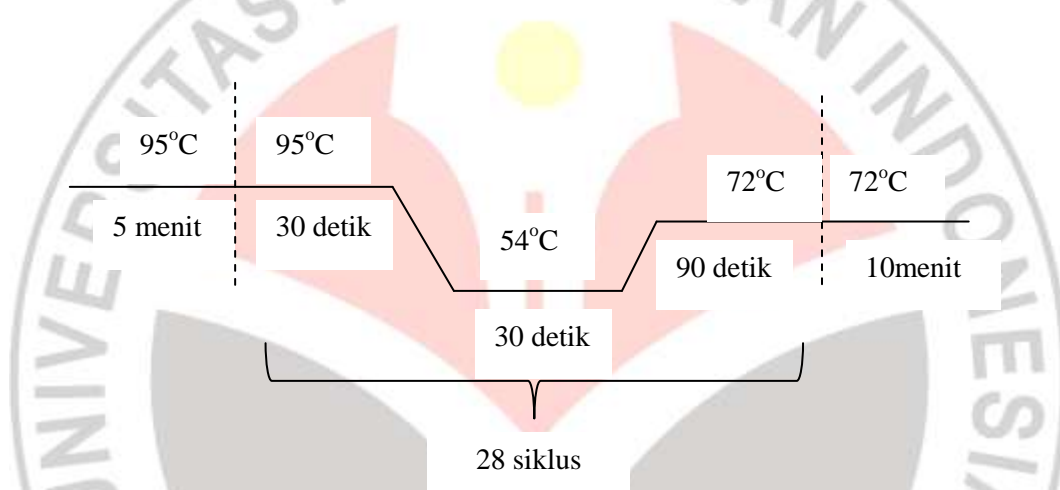
Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

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

Mix sebanyak 25 μ l, Primer F/R masing-masing 2 μ l, DNA templat 4 μ l, dan deion steril 19 μ l. Primer yang digunakan adalah 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') dan 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3').

Proses amplifikasi diawali dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti 28 kali siklus yang terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, proses *annealing* pada suhu 54°C selama 30 detik, proses elongasi pada suhu 72°C selama 90 detik, dan diakhiri proses elongasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Program suhu PCR dalam proses amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Program Suhu PCR yang Digunakan dalam Proses Amplifikasi Gen *16S rRNA*

b. Purifikasi DNA amplicon *16S rRNA*

Hasil amplifikasi gen *16S rRNA* dipindahkan ke dalam tabung 1.5 ml, kemudian DF Buffer sebanyak 5x total volum hasil PCR ditambahkan ke dalam tabung 1.5 ml. Kolom DF ditempatkan pada tabung 2ml (*Collection tabung*), kemudian sampel dipindahkan ke dalam Kolom DF lalu sampel disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 detik. Cairan pada tabung 2ml dibuang, kemudian Kolom DF ditempatkan kembali pada tabung 2ml. Selanjutnya sebanyak 600 μ l Wash buffer dimasukkan pada Kolom DF dengan cara diteteskan tepat pada tengah membrane Kolom DF dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian sampel disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 detik. Larutan pada tabung 2 ml dibuang, kemudian Kolom DF disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 3

Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

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

menit untuk mengeringkan kolom matriks. Selanjutnya Kolom DF dipindahkan pada tabung 1.5 ml yang baru. Setelah itu sebanyak 75 μ l Buffer elusi ditambahkan kedalam Kolom DF melalui kolom matriks pada bagian tengah dan didiamkan selama 7 menit agar buffer elusi dapat diserap oleh matriks dengan sempurna. Setelah itu, sampel disentrifugasi selama 2 menit pada 10.000 rpm.

DNA amplikon hasil purifikasi dianalisis dengan elektroforesis dalam gel agaros 1,5%. Sebanyak 3 μ l DNA dicampur dengan 1 μ l *loading dye*. Kemudian sampel dimasukkan kedalam sumur yang terdapat dalam gel. DNA marker yang digunakan adalah FastRuler DNA *Ladder low range, ready-to-use* sebanyak 2 μ l dicampur dengan deion 1 μ l. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada tegangan 100 volt dengan buffer TBE 1x sebagai *running buffer*. Gel diwarnai dengan Ethium bromide selama 5 menit, kemudian gel dicuci dengan akuades selama 7 menit. Hasil elektroforesis dilihat dengan alat sinar UV dan difoto dengan menggunakan kamera digital merk Cannon.

c. Mengukur konsentrasi DNA Amplikon Hasil Purifikasi

DNA amplikon hasil purifikasi dihitung konsentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pengenceran yang digunakan untuk menghitung konsentrasi DNA amplikon yang telah dipurifikasi adalah 50 kali. Konsentrasi DNA dapat diketahui dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi DNA (ng/}\mu\text{l)} = \text{nilai A}_{260} \times \text{konstanta DNA (50)} \times \text{factor pengenceran}$$

5) Sikuensing

Proses sikuensing dilakukan dengan menggunakan mesin *sequencer* BigDye Applied System model 3730 yang dilakukan di Macrogen inc., Korea. Hasil sikuensing akan dibandingkan pula dengan sikuen *Aeromonas hydrophila* isolat AKS (K.35) hasil penelitian sebelumnya (Wulandari, 2012) dan isolat ATCC 7966 sebagai kontrol.

Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

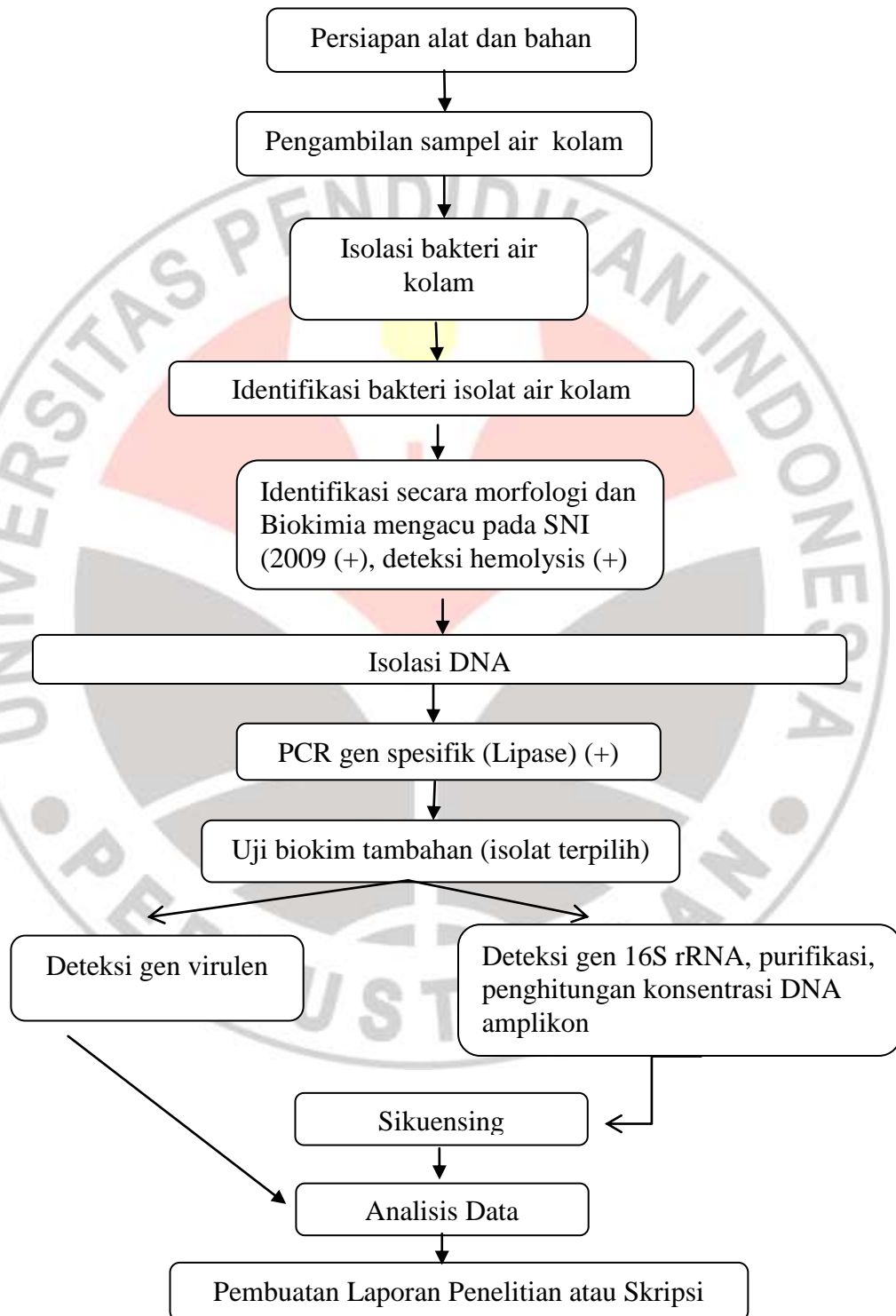
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Analisis data dilakukan dengan menerjemahkan hasil sikuensing kemudian sikuen tersebut disejajarkan dan di bandingkan dengan data sikuen gen *16S rRNA* yang ada di *database* Bank gen NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) di alamat website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>

Proses *alignment* menggunakan program *Tool Multiple-sequence alignment* dari software *Crustal-X* dan software MEGA (*version 5*) untuk menganalisis filogenetika bakteri *Aeromonas spp.* tersebut melalui pohon filogeni.



ALUR PENELITIAN



Visi Tinta Manik, 2013

Identifikasi Dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas* Spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen 16S rRNA

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