

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif. Penelitian membuat deskripsi secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta dan sifat-sifat populasi daerah tertentu (Williams, 2007).

#### 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 7 isolat. Sampel merupakan hasil isolasi yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Fitriani & Herdiansyah, 2016).

#### C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian mulai dilaksanakan dari bulan Maret hingga Juli 2016 di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

#### D. Alat dan Bahan

Peralatan dan bahan yang digunakan selama penelitian merupakan yang tersedia di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dijabarkan pada Lampiran 1.

## E. Langkah Kerja

### 1. Tahap Persiapan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dicuci dan dibersihkan. Alat dan bahan selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 – 20 menit dengan tekanan 1,5 atm. Medium tumbuh bakteri yaitu Luria Bertani (LB) agar dan LB cair juga disterilkan pada keadaan yang sama.

Subkultur bakteri dilakukan pada *laminar air flow* dengan alat dan bahan yang telah disterilkan. Tujuh isolat yang diawetkan pada medium *cryo* ditumbuhkan pada medium LB agar steril. Setiap biakan murni diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan setelah itu dipindahkan kedalam kulkas 4°C. Isolat bakteri ini dijadikan sebagai stok dan disubkultur kembali pada medium agar ketika akan dilakukan isolasi DNA.

### 2. Isolasi DNA Kromosom Bakteri Endofit

Isolasi DNA kromosom bakteri endofit dilakukan dengan kit komersial yaitu *GeneJET Genomic DNA Purification kit Fermentas* (Thermoscientific inc., Lithuania) dengan mengikuti langkah kerja pada protokol kit. Sesuai protokol Isolasi DNA kromosom bakteri endofit diawali dengan menumbuhkan kultur bakteri endofit ke medium cair yaitu LB cair dan ditumbuhkan selama 18 jam. Sebesar 1,5 ml dari medium cair yang telah ditumbuhkan bakteri kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro yang steril. Tabung mikro lalu disentrifugasi selama 10 menit pada 5.000 x g dan supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet yang dihasilkan disuspensikan dalam 180 µL *digestion solution*. Lalu ditambahkan 20 µl larutan proteinase K dan dihomogenkan menggunakan vorteks atau menggunakan pipet agar larutan tercampur rata. Selanjutnya Inkubasi sampel pada suhu 56°C dalam *waterbath shaker* sampai sel benar-benar lisis. Tambahkan 20 µl *RNAse A solution*, homogenkan dengan menggunakan vorteks dan inkubasi selama 10 menit dalam suhu

ruang. Lalu ditambahkan 200  $\mu$ l *lysis solution* ke dalam sampel. Homogenkan menggunakan vorteks selama 15 detik sampai larutan homogen. Setelah itu ditambahkan 400  $\mu$ l etanol 50%, homogenkan menggunakan menggunakan pipet. Pindahkan *lysate* yang telah disiapkan ke dalam *GeneJET Genomic DNA Purification Column* yang telah dimasukkan dalam *collection tube*. Sentrifugasi *column* selama 1 menit pada 6.000 x g. Buang *collection tube* yang mengandung larutan *flow-through*. Masukkan *GeneJET Genomic DNA Purification Column* ke dalam *collection tube* baru ukuran 2 mL. Tambahkan 500  $\mu$ l *wash buffer I* (yang telah ditambahkan etanol). Sentrifugasi selama 1 menit pada 8.000 x g. Buang *flow-through* dan letakan kembali *GeneJET Genomic DNA Purification Column* dalam *collection tube*. Tambahkan 500  $\mu$ l *wash buffer II* (yang telah ditambahkan etanol) ke dalam *GeneJET Genomic DNA Purification Column*. Sentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan maksimum (13.000 x g). Tambahkan 200  $\mu$ l *buffer elution* pada bagian tengah membran *GeneJET Genomic DNA Purification Column* ke dalam *elute genomic DNA*. Inkubasi selama 2 menit pada suhu ruang dan sentrifugasi selama 1 menit pada 8.000 x g. Terakhir buang *GeneJET Genomic DNA Purification Column*. Gunakan DNA yang telah dipurifikasi segera atau simpan pada suhu -20°C hingga proses pengukuran konsentrasi, kemurnian DNA dan amplifikasi.

### 3. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Konsentrasi DNA hasil isolasi ditentukan dengan pengukuran absorbansi DNA dengan menggunakan panjang gelombang 260 nm pada spektrofotometer. Setelah mendapatkan angka konsentrasi DNA, konsentrasi DNA setiap sampel disamakan dengan diencerkan agar kualitas produk amplifikasi bersifat homogen. Kemurnian DNA juga ditentukan dengan menghitung rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm (Sambrook dan Russel, 2001).

a. Konsentrasi DNA =  $A_{260} \times \text{faktor pengenceran} \times 50$  (ng/ $\mu$ l)

b. Kemurnian DNA =  $A_{260}/A_{280}$

#### 4. Elektroforesis DNA

Langkah kerja dilakukan berdasarkan Sambrook & Russel (2001) dengan konsentrasi gel berdasarkan Ayuso-Sacido dan Genilloud (2004). Proses elektroforesis dilakukan pada 1% gel agarosa. Gel agarosa dilarutkan dengan konsentrasi 1% pada *buffer* TBE 0,5X dan dihomogenkan dengan pemanasan pada microwave. Gel agarosa dalam kondisi hangat dituangkan pada cetakan yang telah dilengkapi sisir, untuk membentuk sumur elektroforesis dan dibiarkan hingga memadat.

Cetakan gel yang sisirnya telah dilepas diletakkan pada kolom elektroforesis. Gel direndam dengan *buffer* TBE 0,5X, lalu sebanyak 5 µl ampikon dicampurkan dengan 2 µl *loading dye* dan dimasukkan ke sumur yang tercetak pada gel. Marker yang digunakan yaitu *GeneRuler* 1 kb DNA *Ladder*. Sampel dielektroforesis dengan tegangan 80 volt selama 40 menit. Pewarnaan hasil elektroforesis dengan perendaman gel pada etidium bromida dengan konsentrasi 0,5 µg/ml selama 5 menit. Kelebihan EtBr dibilas dengan aquades, lalu gel diamati di bawah sinar UV. Hasil elektroforesis lalu didokumentasikan.

#### 5. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Ramarathnam *et al.* (2006). Bahan PCR dicampurkan hingga 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* dan jumlah DNA yang digunakan untuk setiap sampel 200 ng. Primer yang digunakan yaitu SUR3F dan SUR3R (441 bp) yaitu untuk mendeteksi gen surfaktin (Athukorala *et al.*, 2009).

Amplifikasi gen surfaktin dilakukan dengan mesin PCR yang digunakan *Mastercycle Personal Machine* (Eppendorf, Jerman)

dengan tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, tahap denaturasi 40 siklus pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 50°C selama 1 menit, tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, tahap akhir ekstensi 72°C selama 10 menit dan tahap inkubasi pada suhu 4°C selama 10 menit.

#### 6. Purifikasi DNA

Purifikasi DNA dilakukan menggunakan *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, USA). Purifikasi DNA dilakukan dengan mencampurkan hasil PCR sebanyak 25 µl dan *wash bind solution* 25 µl. Hasil campuran dimasukan kedalam *SV minicolumn* dan di sentrifugasi selama 1 menit pada 16.000 x g. Lalu ditambahkan *membran wash solution* 700 µl dan di sentrifugasi kembali selama 1 menit pada 16.000 x g. *Membran wash solution* ditambahkan kembali 500 µl dan di sentrifugasi selama 1 menit pada 16.000 x g. Cairan hasil sentrifugasi dibuang dan ditambahkan *nuclease-free water* 50 µl. Sentrifugasi selama 1 menit pada 16.000 x g.

#### 7. Sikuensing DNA

Gen yang telah dipurifikasi disiapkan untuk proses sikuensing. Sebanyak 40 µl masing-masing amplikon dikirim ke Macrogen inc., Korea untuk disikuensing dengan menggunakan mesin *sequencer BigDye Applied Biosystem*. Sikuensing dilakukan dari arah *forward* dan *reverse*.

#### 8. Analisis Data Bioinformatika

Analisis data bioinformatika dilakukan dengan hasil *contig* sikuen gen surfaktin yang didapatkan setelah proses sikuensing. Sikuen lalu dibandingkan dengan data sikuen gen surfaktin pada database bank gen NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk mendapatkan sikuen yang homolog dengan sikuen amplikon. Analisis homologi tersebut dilakukan dengan perangkat lunak BLASTX

([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). Setelahnya, seluruh sikuen ditranslasikan dalam bentuk asam amino dengan pemilihan *reading frame* berdasarkan kecocokan hasil BLASTX. Untuk pembuatan pohon filogenetik maka beberapa data sikuen gen surfaktin diambil dari bakteri dan ada sikuen gen surfaktin diambil dari fungi sebagai *outgroup*. *Alignment* untuk setiap sikuen gen surfaktin dilakukan dengan perangkat lunak Clustal X, lalu dilanjutkan dengan pembentukan pohon filogenetik dengan bantuan perangkat lunak MEGA versi 7.0. Pada percobaan ini dicari domain konservatif pada urutan asam amino yang diperoleh dengan menggunakan perangkat lunak CDS (*Conserved Domain Search*) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

## F. Alur Penelitian

