

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian eksperimen, yaitu penelitian yang melakukan uji coba atau pengamatan khusus untuk membuktikan sesuatu yang bersifat meragukan dan dalam kondisi yang ditentukan oleh peneliti (Nindhia, 2013). Desain dari penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), setiap perlakuan dirancang dengan kondisi yang relatif homogen (Nindhia, 2013). Dilakukan beberapa pengulangan pada setiap perlakuan dalam penelitian berdasarkan perhitungan di bawah ini.

$$t \quad (r-1) \geq 20$$

$$16 \quad (r-1) \geq 20$$

$$16r - 16 \geq 20$$

$$16r \geq 36$$

$$r \geq 2,25 \sim 3$$

Diameter zona hambat yang muncul kemudian diamati dan dilihat interpretasi zona hambat berdasarkan Cappucino dan Sherman (1987) pada antibiotik ampisilin yang diujikan (Tabel 3.1). Sebaran, variasi dan perbedaan rata-rata diameter zona hambat dianalisis menggunakan SPSS 16.0 *for windows*.

Tabel 3.1 Interpretasi zona hambat pada antibiotik ampisilin

Antibiotik	Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)		
		Resisten	Intermediet	Sensitif
Ampisilin	10 µg/ml	≤ 13	14 – 16	≥ 17

(Sumber: Cappucino dan Sherman, 1987)

Bakteri yang memiliki zona hambat paling kecil selanjutnya dilakukan isolasi dan identifikasi secara molekuler untuk mengetahui pola kekerabatan pada bakteri yang resisten terhadap antibiotik ampisilin.

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri endofit dari akar tanaman *Ageratum conyzoides* dan *Vetiveria zizanioides* Cultivation. Sampel yang

Novi Dewi K J, 2017

ANALISIS KEKERABATAN ISOLAT BAKTERI ENDOFIT RESISTEN AMPISILIN PADA KAR TANAMAN OBAT

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

digunakan dalam penelitian ini adalah isolat M, O, H, A, dan K yang telah diisolasi dari akar tanaman *V. zizanioides* Cultv., serta isolat I13, I14, B14, dan B15 yang diisolasi dari akar tanaman *A. conyzoides*. Ke-9 isolat bakteri endofit tersebut kemudian diperbanyak dalam media Luria Bertani (LB) Agar.

C. Waktu dan Lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli hingga Desember 2016. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian merupakan alat dan bahan yang tersedia di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yang tersusun sebagai berikut.

1. Tahap persiapan

Semua alat yang digunakan disterilisasi menggunakan Autoklaf selama 15 – 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan sebesar 1.5 atm. Bahan yang digunakan sebagai medium tumbuh bakteri yaitu *Luria Bertani* (LB) agar dan *LB broth* juga disterilisasikan.

2. Tahap Penelitian

a) Subkultur bakteri endofit

Isolat bakteri endofit yang digunakan dalam penelitian ini di subkultur dari 9 *cryopreservation* isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian sebelumnya. Isolat bakteri kemudian ditumbuhkan dalam medium LB agar dan diinkubasi dalam suhu ruang.

b) Penapisan resistensi antibiotik

Sebanyak satu loop koloni bakteri endofit diinokulasikan ke dalam larutan fisiologis NaCl 0,85 % kemudian di vortex hingga homogen dan diukur turbiditasnya menggunakan standar 0,5 McFarland dan diketahui densitasnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm sehingga diketahui nilai absorbansi bakteri sekitar 0,08-0,13 (Wiegand *et al.*, 2008). Pengukuran ini bertujuan untuk mengetahui jumlah bakteri yang diuji agar setara dengan 5×10^5 cfu/ml. Sebanyak 1 ml bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian dihomogenkan. Pada cawan petri yang berisi bakteri, ditambahkan 9 ml LB agar kemudian dihomogenkan. Setelah agar menjadi dingin, dimasukkan cakram dengan konsentrasi ampisilin 10 µg/ml, 20 µg/ml dan 30 µg/ml serta satu cakram berisi akuades sebagai kontrol negatif. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam kemudian diamati diameter zona hambat yang muncul (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2003).

c) Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) dengan mengikuti langkah kerja pada protokol kit. Kultur bakteri yang telah ditumbuhkan dalam medium LB *broth* diambil sebanyak 1,5 ml dan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi steril kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 5000 x g. Pelet disuspensikan dalam 180 µl *Digestion solution* kemudian ditambahkan 20 µl larutan Proteinase K dan dihomogenkan menggunakan vorteks atau menggunakan pipet agar larutan tercampur rata. Sampel diinkubasi pada suhu 56°C dalam *waterbath shaker* sampai sel benar-benar lisis (~30 menit). setelah sel benar-benar lisis, pada sampel kemudian ditambahkan 20 µl *RNAse A solution* dan dihomogenkan dengan menggunakan vorteks serta diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang. Sampel yang telah diinkubasi kemudian ditambahkan 200 µL *Lysis solution* dan dihomogenkan menggunakan vorteks selama 15 detik sampai larutan homogen. Sampel kemudian ditambahkan 400 µl etanol 50% dan dihomogenkan menggunakan vorteks atau menggunakan pipet. *Lysate* yang telah

disiapkan dipindahkan ke dalam *DNA Purification column* yang telah dimasukan dalam *collection tube*. Column disentrifugasi selama 1 menit pada 6000 x g kemudian dibuang larutan *flow-through* dalam *collection tube*. *Purification column* kemudian dimasukkan ke dalam *collection tube* baru ukuran 2 ml. Ditambahkan 500 µl *Wash buffer I* pada sampel dan disentrifugasi selama 1 menit pada 8000 x g. *Flow-through* pada *collection tube* dibuang. *Collection tube* diletakan kembali dalam *purification column*. ditambahkan 500 µl *Wash buffer II* ke dalam *Purification column* dan disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan maksimal (13000 x g). *Collection tube* yang mengandung larutan *flow-through* dibuang dan *Purification column* dipindahkan pada tabung mikrosentrifugasi steril ukuran 1,5 ml. Ditambahkan 200 µl *Buffer Elution* pada bagian tengah membran *Purification column* kemudian sampel diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi selama 1 menit pada 8000 x g. *Purification column* kemudian dibuang. DNA yang telah dipurifikasi dapat disimpan pada suhu -20°C.

d) Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA

Berdasarkan Sambrook dan Russel (2001), pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer. Untuk mengukur konsentrasi DNA digunakan panjang gelombang 260 nm. Data hasil pembacaan menggunakan spektrofotometer dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Kemurnian DNA ditentukan dengan menghitung rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Data hasil pembacaan menggunakan spektrofotometer dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{[A_{260}]}{[A_{280}]}$$

e) Amplifikasi gen *16S rRNA*

Proses amplifikasi dilakukan dengan metode PCR. Volume akhir yang digunakan dalam campuran bahan PCR untuk satu reaksi adalah 20 µl. Langkah pertama, ke dalam tabung mikrosentrifugasi dimasukkan 10 µl DreamTaq Green PCR Master Mix 1x (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1 µM primer 63F, 1 µM

primer 1387R, dan 7 μl *water free nuclease*. Semua larutan yang telah dicampurkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi kemudian dihomogenkan. Larutan yang terdapat dalam tabung mikrosentrifugasi kemudian dipindahkan ke dalam tabung PCR dan dimasukkan 1 μl DNA template. DNA yang digunakan untuk setiap sampel adalah 100 ng. Larutan yang telah dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan pengaturan suhu pre-denaturasi 95°C selama 5 menit, suhu denaturasi 94°C selama 1 menit, suhu annealing 51°C selama 1 menit, suhu elongasi 72°C selama 1 menit, suhu elongasi akhir 72°C selama 10 menit dan suhu penyimpanan 4°C. Tahapan amplifikasi ini diprogram untuk melakukan siklus berulang sebanyak 45 kali. Hasil amplifikasi kemudian dilihat melalui analisis elektroforesis gel (Lyra *et al.*, 2013).

f) Elektroforesis

Elektroforesis gel secara horizontal dilakukan untuk mengetahui hasil amplifikasi dan mengecek kualitas DNA. Prosedur penelitian dilakukan dengan mengikuti langkah kerja berdasarkan Sambrook dan Russel (2001). Agarose yang digunakan dalam penelitian ini merupakan agarose 1% yang dilarutkan dalam larutan buffer TBE 0,5x sebanyak 30 ml. Larutan agarose dihomogenkan menggunakan microwave selama 90 detik. Larutan agarose yang telah homogen, dalam kondisi hangat dituang ke dalam cetakan yang telah dilengkapi sisir kemudian didiamkan hingga memadat. Sisir pada gel agarose yang telah memadat kemudian dilepas sehingga tampak sumur-sumur gel agarose. Gel agarose dipindahkan pada kolom elektroforesis yang telah direndam dengan larutan buffer TBE 0,5x.

Sebanyak 2 μl sampel hasil amplifikasi dicampurkan dengan 1 μl *Loading dye* dan dimasukkan dalam sumur gel agarose 1% yang direndam dalam larutan buffer. Sampel kemudian dielektroforesis selama 40 menit dengan voltase 80 V. Gel berisi sampel hasil elektroforesis direndam dalam larutan *Ethidium Bromide* (EtBr) 0,5 $\mu\text{g/ml}$ selama lima menit kemudian dibilas menggunakan aquadest selama 3 menit. Agar-agar yang telah direndam dalam larutan EtBr kemudian dilihat dan diamati visualisasinya menggunakan UV transilluminator.

g) Sikuensing DNA

Sampel DNA yang telah diamplifikasi kemudian dipurifikasi dan disikuensing. Sebanyak 40 µl dari masing-masing amplikon dan 40 µl primer *forward* dikirimkan untuk kemudian dilakukan sikuensing menggunakan mesin sequencer BigDye Applied Biosystem di Macrogen Inc., Korea.

h) Analisis data Statistika

Analisis data yang dilakukan menggunakan program SPSS 16.0 *for windows*. Data yang dianalisis berupa hasil pengukuran rata-rata diameter zona hambat pada penapisan resistensi antibiotik. Jenis analisis data yang dilakukan diantaranya:

1) Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui sebaran data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik.

2) Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui variansi data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik. Uji statistik parametrik dapat dilakukan apabila sebaran data normal dan homogen. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka dilakukan uji statistik non-parametrik.

3) Uji *Mann-Whitney U*

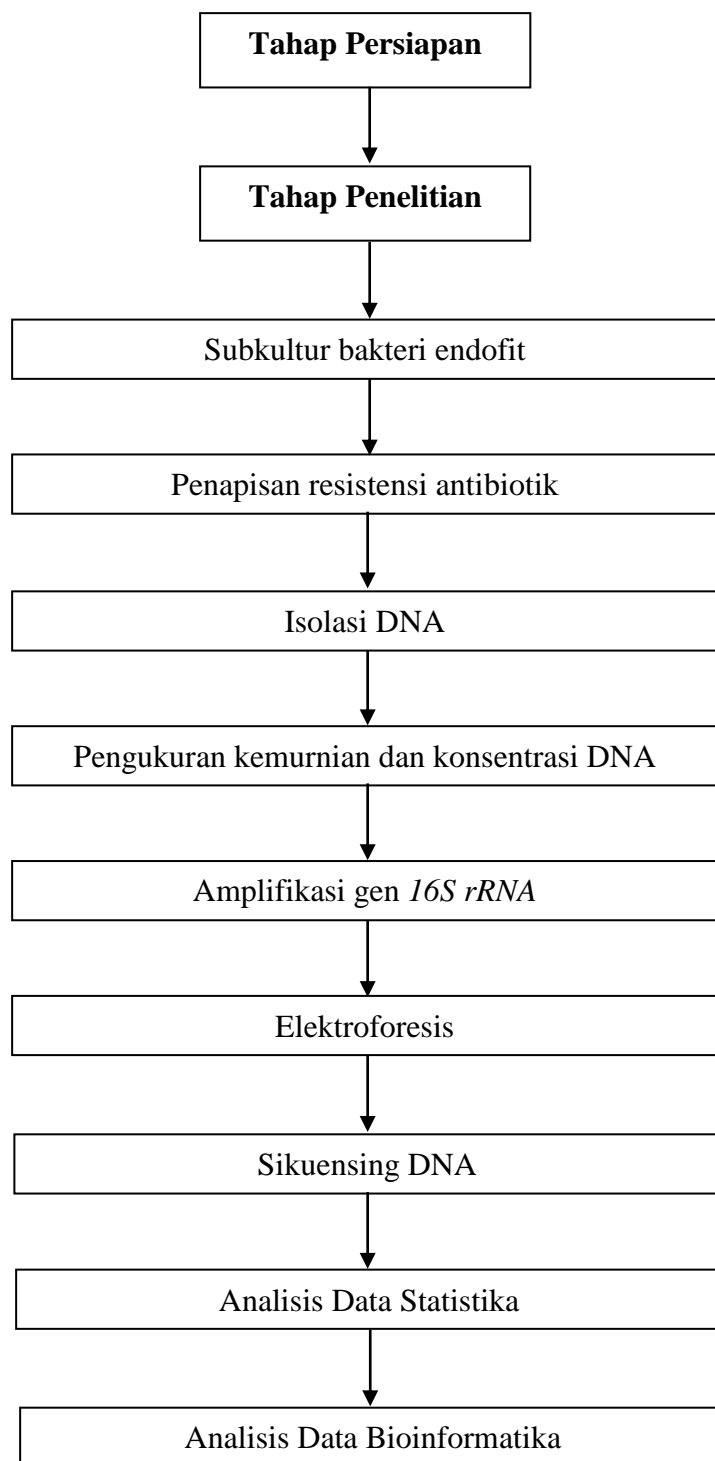
Uji statistik non-parametrik *Mann-Whitney U* dilakukan untuk mengetahui perbedaan nyata rata-rata diameter zona hambat yang terjadi pada sebaran data yang tidak homogen.

i) Analisis data Bioinformatika

Data hasil sikuensing dibandingkan dengan data yang tersedia pada database NCBI dan diidentifikasi sampai tingkat spesies melalui analisis sikuen gen 16S rRNA menggunakan metode *Nucleotide* BLAST. Sikuen gen yang diperoleh kemudian dilakukan pensejajaran dan dibandingkan dengan data sikuen gen lain. Proses *alignment* pada sikuen dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Clustal X, dilanjutkan dengan pembentukan pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.0.20 (Kumar *et al.*, 2016) untuk menganalisis filogenetika bakteri endofit resisten ampisilin yang dihasilkan.

F. Alur Penelitian

Berikut alur penelitian yang digambarkan dalam bagan di bawah ini.



Gambar 3.1 Bagan alur penelitian