

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode deskriptif (Nazir, 1983).

#### B. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah populasi mikroba endofit yang terdapat dalam akar tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. sedangkan untuk sampel yang diamati adalah DNA mikroba endofit yang positif mengandung gen poliketida sintase khususnya domain ketosintase pada akar *A. conyzoides* L.

#### C. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah materi genetik (DNA) terutama domain gen ketosintase pada mikroba endofit akar *A. conyzoides* L.

#### D. Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret 2012 sampai bulan Agustus 2012 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Fisiologi Fakultas FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

#### E. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat dalam laboratorium Mikrobiologi, adapun daftar alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini dapat dilihat dalam Lampiran 2 dan Lampiran 3.

#### F. Cara Kerja

##### 1. Pengambilan sampel

Isolasi mikroba endofit dilakukan menurut metode F. Tomita. Akar tanaman *A. conyzoides* dikoleksi dari Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia dan

kemudian sampel tanaman dibersihkan dari kotoran dengan cara mencucinya dengan air mengalir. Kemudian akar tanaman dipotong-potong agar tidak terlalu panjang, selanjutnya disterilisasi permukaan menggunakan larutan etanol 75% selama 1 menit, bayclin 25% selama 5 menit, dan terakhir dengan etanol kembali selama 30 detik. Setelah itu sampel dibilas dengan air steril beberapa kali. Selanjutnya, potongan tadi direndam dalam larutan fisiologis sambil divortex untuk mengeluarkan bakteri endofit dalam jaringan tumbuhan (Modifikasi Lumyong *et al.*, 2001).

## 2. *Enricment Media*

Sebanyak 1 ml larutan hasil vortex diambil kemudian dimasukkan kedalam medium LB (LB) *Broth*. Medium diinkubasi sambil dihomogenkan dengan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 16 jam dalam suhu ruang (Modifikasi Sambrook & Russel ; Wahyudi *et al.*, 2010).

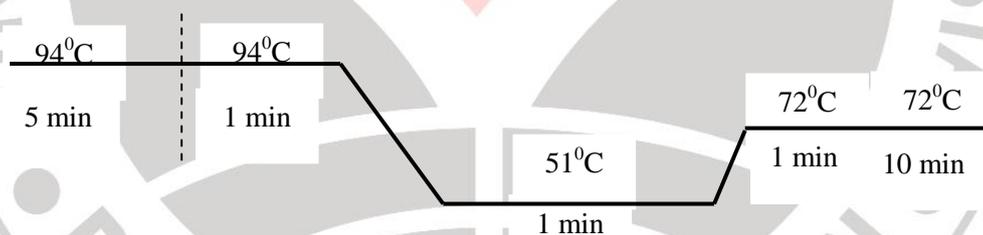
## 3. *Isolasi DNA*

Isolasi DNA dilakukan dengan mengambil 1.5 ml kultur hasil *enrichment* dimasukkan kedalam tabung *eppendorf* selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm selama 3 menit. Selanjutnya *supernatan* dibuang dan pellet diisolasi dengan metode yang tersedia pada katalog “*FERMENTAS DNA Purification KIT*”. Pellet hasil sentrifugasi ditambahkan 200 µl larutan *TE buffer* lalu diresuspensikan hingga homogen. Selanjutnya, ditambahkan 400 µl larutan *lysis solution* ke dalam tabung *eppendorf*. Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, kemudian ditambahkan 600 µl kloroform ke dalam tabung tersebut dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik 3-5 kali. Sentrifugasi suspensi pada tabung tersebut pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Setelah sentrifugasi, fasa cair atas yang terbentuk dipindahkan pada tabung mikrosentrifugasi yang baru dan ditambahkan 800 µl larutan presipitasi (80 µl larutan *precipitation solution* dilarutkan dengan 720 µl ddH<sub>2</sub>O steril) lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang secara hati-hati lalu ditambahkan 100 µl NaCl *solution* (1,2 M) pastikan pelet DNA larut. Kemudian ditambahkan RNase A *free DNase* sebanyak 10 µl lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 300 µl etanol absolut dingin,

kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 1-20 jam. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan pada lapisan atas dibuang secara hati-hati sampai habis. Tutup tabung mikrosentrifugasi dibiarkan terbuka sampai alkohol menguap dan pelet DNA mengering. Pelet DNA kemudian dilarutkan dalam 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O steril dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk digunakan pada proses amplifikasi.

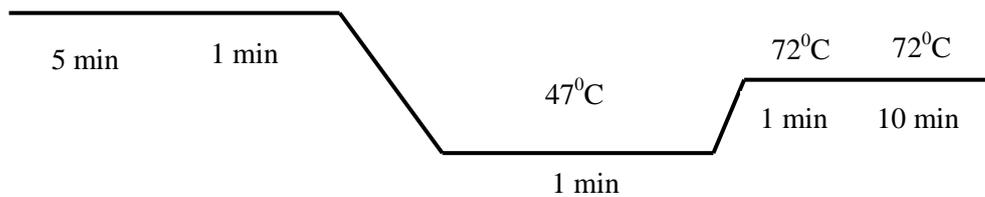
#### 4. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Proses amplifikasi KS domain non heterokits glikolipid dilakukan dengan memasukkan 3  $\mu\text{l}$  DNA sampel kedalam tabung PCR yang sudah berisi 5  $\mu\text{l}$  10x Taq Buffer, 5  $\mu\text{l}$  dNTP Mix 2mM, 2.5  $\mu\text{l}$  primer DKF 10 mM, 2.5  $\mu\text{l}$  primer DKR 10 mM, 0.25  $\mu\text{l}$  Taq Polimerase 5U dan 32.75  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (Fermentas, 2011). Selanjutnya dilakukan perbanyakkan sampel DNA dengan menggunakan mesin PCR *eppendorf tube* dengan kondisi : *pre start* pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, *denaturasi*  $94^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *annealing*  $51^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *extention*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *post PCR*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, dilakukan perbanyakkan sebanyak 35 siklus (Jing *et al.*, 2011).



**Gambar 3.1** : Kondisi PCR KS primer *denegerate oligonucleotida*

Sedangkan amplifikasi KS domain heterokits glikolipid dilakukan dengan memasukkan 2  $\mu\text{l}$  DNA sampel kedalam tabung PCR yang berisi 5  $\mu\text{l}$  Buffer A, 5  $\mu\text{l}$  5x KAPA Enhancer, 0.5  $\mu\text{l}$  dNTP Mix 10 mM, 1.25  $\mu\text{l}$  primer HGLF 10 mM, 1.25  $\mu\text{l}$  primer HGLR 10 mM, 0.2  $\mu\text{l}$  Taq Polimerase 1U dan 9.8  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (Kapabiosystem, 2012). Selanjutnya juga dilakukan perbanyakkan dengan menggunakan mesin PCR *eppendorf tube* dengan siklus : *pre start* pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, *denaturasi*  $94^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *annealing*  $47^{\circ}\text{C}$  selama 1menit, *extention*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *post PCR*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, juga dilakukan perbanyakkan sebanyak 35 siklus.



5. **Gambar 3.2** : Kondisi PCR KS domain *heterocyst glikolipid*

ngan 75

volt dan di *running* selama 45 menit dalam buffer TBE 1× dengan menggunakan alat elektroforesis *BIORAD*.

## 6. Purifikasi Hasil PCR

Proses purifikasi dilakukan dengan metode sentrifugasi dimana hasil ampikon atau potongan gel agarose yang positif mengandung gen yang diinginkan dipotong selanjutnya dilakukanlah proses purifikasi berdasarkan protokol yang sudah tersedia didalam katalog *WIZARD DNA Purification System* (Promega, USA). Dimana tabung *ependorf* dan potongan gel yang positif mengandung gen yang diinginkan ditimbang untuk mengetahui berat masing – masing, selanjutnya tambahkan *membrane binding solution* dengan perbandingan berat gel sama dengan volume yang ditambahkan, campuran divortex dan diinkubasi pada suhu 50 - 60<sup>0</sup> C sampai potongan gel terlarutkan semuanya. Tabung disentrifugasi secara singkat untuk memastikan DNA berada pada dasar tabung. Masing – masing *SV minicolumb* diambil dan diletakkan pada *collection tube* kemudian diinkubasi 1 menit pada suhu kamar untuk selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, cairan yang terdapat pada *collection tube* dibuang kemudian *SV minicolumb* dikembalikan pada *collection tube*, kemudian tambahkan 700 µl *membrane wash solution*. Sentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, buang lagi cairan pada *collection tube* untuk kemudian ditambahkan lagi 500 µl *membrane wash solution*. Sentrifugasi lagi *SV minicolumb* dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Kosongkan *collection tube* dan sentrifugasi *SV minicolumb* bersama *collection tube* dalam keadaan kosong dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit untuk menguapkan residu etanol. Selanjutnya *SV minicolumb* dipindahkan ke tabung *ependorf* yang baru untuk kemudian ditambahkan 50 µl *nuclease free water*, sentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya DNA hasil purifikasi disimpan pada suhu - 20<sup>0</sup>C..

## 7. Kloning Gen Ketosintase

Gen ketosintase dikloning kedalam pGEM – T *Easy vector* (Promega, USA). Dimana sebanyak 11 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl 2X Buffer ligasi, 1 µl vektor PGEM-T Easy, 5 µl insert dan 1 µl enzim T4 Ligasi di masukkan kedalam tabung *ependorf* steril. Setelah itu sampel disimpan pada suhu 4°C dan diamankan bermalam. Besok paginya sampel dipindahkan ke freezer bersuhu -20°C.

## 8. Transformasi Hasil Kloning

DNA yang sudah dikloning selanjutnya ditransformasikan kedalam bakteri *E.coli* DH5α yang sebelumnya sudah dibuat kompetent dengan teknik CaCl<sub>2</sub> dingin (Sambrook & Russel 2001). Selanjutnya dilakukan seleksi biru – putih dimana sampel disebarakan diatas medium LA yang sudah ditambahkan X-gal (40µg/µl) dan Ampisilin (100 µg/µl) kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

## 9. Isolasi DNA Plasmid Rekombinan

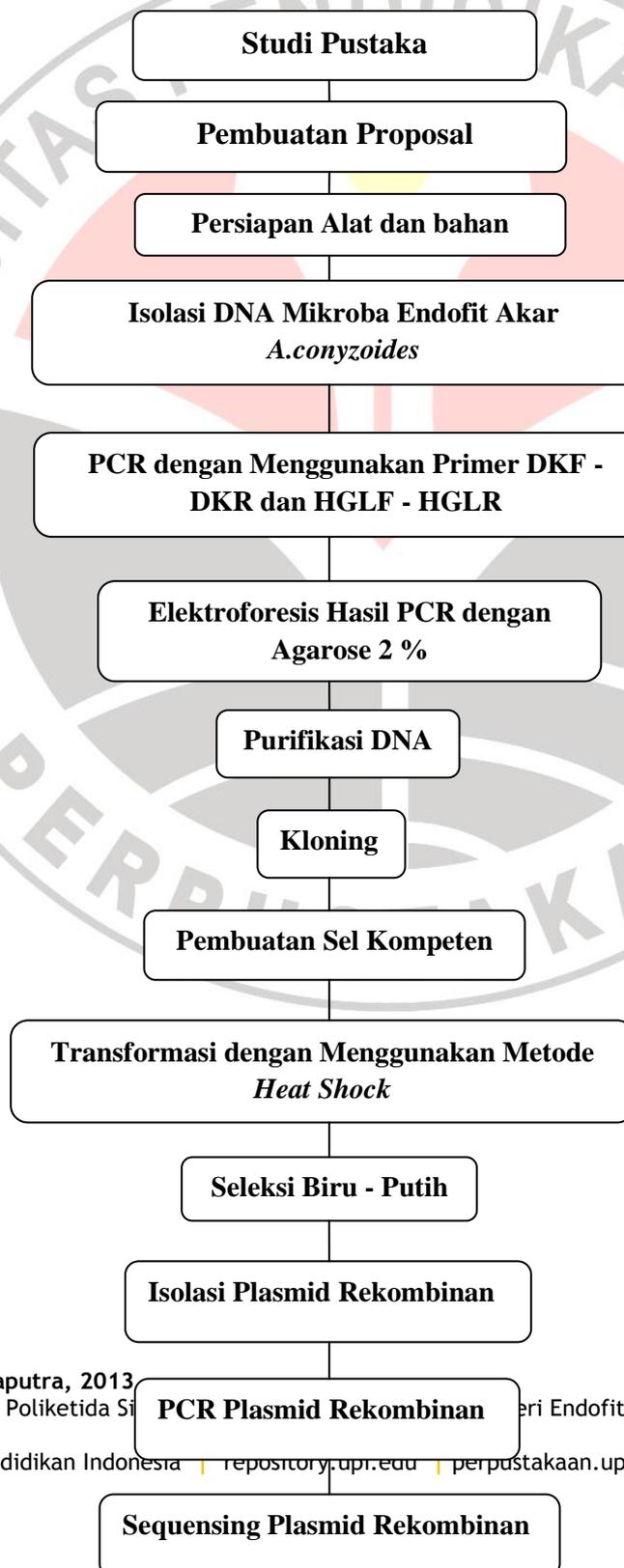
Isolasi DNA plasmid dilakukan berdasarkan metode yang tersedia dalam Sambrook & Russel 2001. Sebanyak 1.5 kultur bakteri yang telah berumur 16 jam dimasukkan kedalam tabung *ependorf* kemudian sisenrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang selanjutnya *pellet* diresuspendisikan dengan 100 µl solution I dingin kemudian di vortex sampai homogen. Tambahkan 200 µl solution II segar homogenkan dengan membalik tabung secara cepat. Tambahkan 150 µl solution III dingin vortex halus dan simpan tabung diatas es selama 3-5 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit pindahkan supernatan ketabung *ependorf* yang baru. Tambahkan etanol absolut 2X volume inkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Sentrifugasi lagi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit buang supernatan dan keringkan tabung, tambahkan lagi 1 ml etanol 70% kemudian keringkan diudara selama ± 10 menit. Selanjutnya resuspendisikan plasmid dengan menambahkan 20 µl ddH<sub>2</sub>O.

## 10. Sekuensing Plasmid Rekombinan

Proses sequencing dilakukan dengan mengirimkan sampel pada perusahaan *Macrogen Sequencing Order System*, Macrogen Inc. Geumchen-gu Seoul, Korea. Selanjutnya hasil sequencing dianalisis berdasarkan analisis bioinformatika.

## 11. Alur Penelitian

Skema alur penelitian “Analisis Hasil Kloning Domain Kethosynthase pada Mikroba Endofit Akar *Ageratum conyzoides* L



**Gambar 3.3** Diagram Alur Penelitian

