

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian yang dilakukan dengan metode deskriptif, yaitu suatu metode penelitian 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 pada penelitian ini adalah seluruh bakteri termofilik yang berada pada lokasi pengambilan di sumber air panas Gunung Wayang Windu, Pangalengan. Sampel yang diteliti adalah bakteri termofilik yang tersaring pada kertas *microfiber* 0,2 μm dari 800 ml sampel air panas yang berasal dari sumber air panas Gunung Wayang Windu, Pangalengan yang berada pada suhu 55⁰C dan pH 7.

C. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini adalah bakteri termofilik yang terdapat pada sumber air panas Gunung Wayang Windu Pangalengan, Bandung.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2014 sampai November 2014. Lokasi penelitian bertempat di Laboratorium Rekayasa Genetika, Kultur Jaringan dan Mikologi Gedung Pusat Ilmu Hayati, Institut Teknologi Bandung.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Rekayasa Genetika, Kultur jaringan dan Mikologi Gedung Pusat Antar Universitas (PAU), Institut Teknologi Bandung. Alat dan bahan yang digunakan tertera pada lampiran I.

F. Prosedur Penelitian

Proses pada penelitian ini terdiri dari tiga tahap utama yaitu pengukuran suhu sumber air panas Gunung Wayang Windu, Pangalengan pada tempat pengambilan sampel yang sesuai dengan suhu pertumbuhan bakteri termofilik yaitu 55 °C (Madigan *et al*, 2009; Prescott *et al*, 2005), isolasi DNA metagenom dari sampel air yang diambil secara steril menggunakan metode CTAB (Marshall (dalam Hidayat *et al*, 2012) dengan sedikit modifikasi, dan tahap ketiga adalah uji kualitas dan kuantitas dari hasil isolasi DNA metagenom yang telah dilakukan pada tahap sebelumnya dan akan menjadi indikator keberhasilan metode ini.

1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan meliputi persiapan dan sterilisasi alat yang digunakan beserta pembuatan medium. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan untuk pengambilan sampel, isolasi DNA, elektroforesis, dan spektrofotometri. Alat yang digunakan untuk mengambil sampel adalah botol kaca berwarna gelap yang steril. Pembuatan buffer ekstraksi untuk isolasi DNA dilakukan dengan menambahkan β mepcartoetanol dan *Polivynilpirolidone* (PVP) ke larutan CTAB. Alat dan bahan yang perlu disterilkan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan di *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

a. Pengambilan Sampel

Sampel diambil di daerah sumber air panas Gunung Wayang Windu, Pangalengan. Sampel air diambil sebanyak 1,6 liter dengan menggunakan botol sampel berwarna gelap yang telah disterilkan sebelumnya. Pengambilan sampel dilakukan secara cepat dengan menggunakan tali. Botol kemudian di tutup rapat dengan menggunakan plastik tahan panas yang steril dan api disekitarnya agar tidak terjadi kontaminasi.

Suhu air tempat sampel air diambil, diukur menggunakan termometer dengan memasukan termometer selama 3 menit ke dalam titik pengambilan

dan pH air diukur dengan menggunakan pH indikator yang dibandingkan dengan skala standar pH indikator universal.

2. Tahap Penelitian

a. Isolasi DNA

1) Preparasi CTAB

Tahap preparasi ekstraksi CTAB yaitu *buffer* CTAB, kloroform, isopropanol, etanol 70%, etanol 95% dan *buffer* TE dipersiapkan terlebih dahulu. Isopropanol, amonium asetat dan etanol didinginkan dengan cara disimpan pada lemari es bersuhu -20°C . Kertas saring direndam pada *buffer* CTAB sebentar sebelum digunakan untuk menyaring sampel. Sebanyak $25\mu\text{l}$ β -mercaptoethanol dan 0,2 gram *Polivinylpirolidone* (PVP) dicampurkan ke dalam 5 ml *buffer* CTAB dan dimasukkan ke dalam *waterbath* pada suhu 55°C selama 1 jam dengan memasukan kertas saring hasil penyaringan sampel air tadi. Selama proses inkubasi, *buffer* di goyang-goyang per 15 menit secara pelan agar tidak terbentuk gelembung.

2) Isolasi dengan metode CTAB

Metode isolasi DNA metagenom dilakukan berdasarkan metode isolasi CTAB Marshall (dalam Hidayat *et al.*, 2012) dengan sedikit modifikasi. Sebelum melakukan isolasi CTAB, sebanyak 800 ml sampel air disaring secara steril terlebih dahulu menggunakan kertas saring *microfiber* $0,2\ \mu\text{m}$ yang sebelumnya direndam dalam larutan *buffer* CTAB. Selesai sampel disaring, kertas *microfiber* $0,2\ \mu\text{m}$ yang digunakan untuk penyaringan diambil dan direndam pada 5 ml campuran *buffer* CTAB. Sampel kemudian disaring kembali dengan menggunakan kertas saring *microfiber* yang baru dengan tahap penyaringan sampel seperti sebelumnya. Keseluruhan larutan *buffer* CTAB yang digunakan untuk merendam kertas *microfiber* tersebut kemudian dibolak-balik secara perlahan sebanyak 2-3 kali, lalu larutan diinkubasi selama 1 jam pada *waterbath* dengan suhu 55°C . Setiap 30 menit larutan di *shake* secara perlahan. Setelah satu jam kertas *microfiber* diambil menggunakan pinset steril dalam laminar kemudian larutan diisolasi.

Isolasi dilakukan dengan mengambil 0,5 ml larutan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 ml ditambah 1 ml kloroform. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13200 rpm selama 7 menit. Fasa atas kemudian diambil dan ditambahkan isopropanol : ammonium asetat (0,54 : 0,08) dengan rincian penambahan pada lampiran II. Tabung kemudian dibolak-balik sebanyak 30 kali kemudian disimpan pada suhu -20°C selama semalam. Larutan yang sudah disimpan selama semalaman kemudian disentrifugasi kembali selama 30 menit pada kecepatan 13200 rpm. Supernatan dibuang dan ditambahkan 700 μl alkohol 70% lalu tabung dibolak-balik sebanyak 10 kali, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13200 rpm. Supernatan yang terdapat pada tabung mikro yang telah disentrifugasi tersebut kemudian dibuang, selanjutnya ditambahkan alkohol 95% dengan perlakuan sama. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan membolak-balikannya selama 15 menit. Kemudian 25 μl TE buffer ditambahkan. Tabung sample diberi label, A,B, dan C merupakan banyaknya pengulangan dan 1 atau 2 merupakan penyaringan pertama atau kedua. Sampel disimpan pada suhu ruang selama semalam. Terakhir DNA metagenom disimpan pada lemari es bersuhu -20°C .

b. Uji Kualitatif dengan Elektroforesis

Sampel metagenom DNA yang sudah diisolasi dengan metode CTAB masuk ke tahap selanjutnya yaitu tahap pengujian secara kuantitatif dan kualitatif. Hasil isolasi DNA dapat diketahui dengan dua cara yaitu secara kualitatif dengan metode elektroforesis gel agarosa dan secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri (Braun, 1982).

Elektroforesis melalui gel agarosa merupakan metode standar untuk pemisahan, identifikasi, dan pemurnian fragmen DNA (Sudjadi, 2008). Uji kualitatif berupa elektroforesis ini secara umum merupakan suatu teknik pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium atau media penyangga yang mengandung sampel yang akan dipisahkan (Yuwono, 2005).

Tahap awal uji kualitatif dengan metode elektroforesis gel agarose dilakukan dengan membuat gel agarose terlebih dahulu. Konsentrasi gel yang

dibuat adalah 0,7%. Gel dibuat dan didiamkan hingga suam kuku, kemudian dimasukkan ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir sebagai sumur nantinya, gel kemudian didiamkan hingga dingin dan membeku. Gel diambil dan diletakkan pada kolom elektroforesis. Ditambahkan TAE 1x ke dalam kolom hingga gel agarose terendam. Sebanyak 1 μ l DNA dicampurkan dengan 4 μ l *loading dye* dan kemudian dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Proses ini menggunakan TAE 1x yang *dirunning* pada kondisi 100 volt selama 25 menit.

Setelah selesai gel diangkat dan direndam dalam EtBr selama 3 menit kemudian dibilas menggunakan aquades untuk membersihkan kelebihan EtBr. Etidium bromida (EtBr) adalah pewarna fluoresen untuk deteksi asam nukleat, Etidium bromida ini akan mengikat pada sela-sela pasangan basa DNA (Fatchiyah, 2011) dan akan berfluoresensi di bawah sinar UV sehingga memungkinkan visualisasi DNA pada gel (Wibowo, 2008). Gel kemudian diletakkan diatas UV transiluminator. UV transiluminator kemudian dinyalakan, hasil difoto didokumentasikan menggunakan kamera digital.

c. Uji Kuantitatif dengan Spektrofotometer

Uji kuantitatif dilakukan sebagai data pendukung pada sampel yang positif terdapat pita DNA metagenom dengan melihat nilai kemurniannya. Nilai kemurnian dapat diperoleh dengan menghitung absorbansinya, peralatan yang dibutuhkan untuk metode absorbansi adalah spektrofotometer yang dilengkapi dengan lampu UV, *cuvettes* (tabung kaca) tranparan-UV dan larutan DNA yang telah dimurnikan (Muftchah *et al*, 2010).

Pengujian kuantitatif diukur menggunakan spektrofotometer UV Genesis, Thermocientific. Sampel DNA metagenom hasil isolasi sebanyak 1 μ l diambil dan diencerkan dengan 50x pengenceran. Sampel DNA genom yang sudah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung kuvet khusus selanjutnya dimasukkan ke dalam spektrofotometer.

Pita ganda pada DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedang kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Dengan adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini, kemurnian DNA dapat diukur

dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280.

Mengukur kemurnian DNA dapat digunakan rumus sebagai berikut;

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{\text{Å}260}{\text{Å}280}$$

Keterangan:

Å 260 = Nilai absorbansi pada 260 nm

Å 280 = Nilai absorbansi pada 280 nm

nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8 – 2,0. Jika nilai melebihi 2,0 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan dari protein membran/ senyawa lainnya sehingga kadar DNA yang di dapat belum murni. Jika kurang dari 1,8 maka ddH₂O yang diambil terlalu banyak sedangkan DNA yang diambil terlalu sedikit (Fatchiyah, 2011).

Mengukur konsentrasi DNA dapat digunakan rumus sebagai berikut;

$$[\text{DNA}] = \text{Å}260 \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

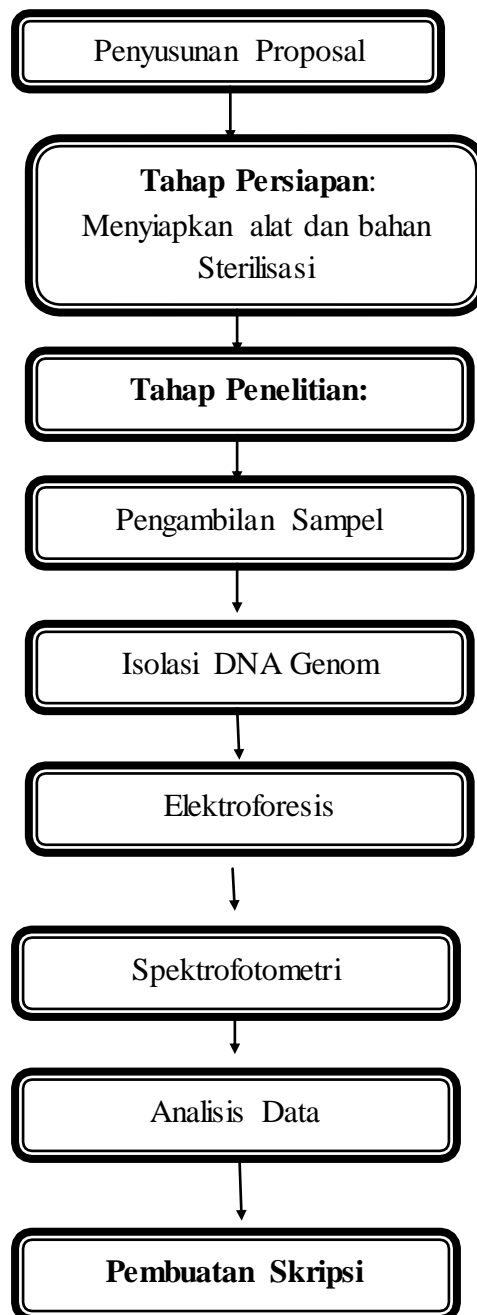
Keterangan:

Å 260 = Nilai absorbansi pada 260 nm

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 µg untai ganda DNA per ml

d. Analisis Data

Keseluruhan hasil yang diperoleh kemudian dianalisis. Analisis data dilakukan dengan melihat hasil DNA metagenom secara kualitatif dan secara kuantitatif. Secara kualitatif dilakukan dengan cara melihat hasil elektroforesis dan secara kuantitatif dilakukan dengan melihat rasio Å260/Å280 pada spektrofotometer. Data yang diperoleh kemudian dibahas sesuai dengan teori yang ada.

e. Alur Penelitian**Gambar 3.1** Diagram Alur Penelitian