

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif.

B. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah isolat fungi dengan kode RY yang diperoleh dari hutan Kalimantan.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Mei 2013 di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.299 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia.

Tabel 3.1 Alat yang diperlukan dalam penelitian

No	Nama alat	Jumlah	Spesifikasi
1	<i>Hot plate</i> dan <i>magnetic stirrer</i>	1 unit	Merk Eyela, RSCH-3
2	<i>Beaker glass</i>	1 buah	Merk Pyrex
3	Kaca arloji	2 buah	-
4	Timbangan analitik	1 unit	Merk DAN, HF 300
5	Spatula	6 buah	Logam
6	Batang pengaduk	1 buah	P = 29,5 cm
7	Gelas ukur 10 mL	1 buah	Merk Pyrex
8	Gelas ukur 50 mL	1 buah	Merk Pyrex

No	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
9	Gelas ukur 150 mL	1 buah	Merk Pyrex
10	Labu Erlenmeyer	5 buah	Merk Pyrex dan Duran
11	Tabung reaksi	30 buah	Merk Pyrex
12	Cawan petri	30 buah	Merk Pyrex
13	Cawan petri <i>disposable</i>	20 buah	Merk Falcon
14	Batang sumpit	Secukupnya	-
15	Kertas saring	30 buah	Whatman No.1
16	<i>Objek glass</i>	30 buah	Sail brand
17	<i>Cover glass</i>	60 buah	Sail brand
18	Lup inokulasi	10 buah	P = 22,5 cm
19	Lampu spirtus	1 buah	-
20	Mortar dan alu	5 buah	-
21	Rak tabung	2 buah	-
22	Plastik tahan panas	5 pak	Merk Diamond
23	Kain kassa	5 bungkus	-
24	Kapas	2 bungkus	-
25	Tali kasur	2 gulung	-
26	<i>Tissue</i>	3 bungkus	Merk Paseo
27	<i>Alumunium foil</i>	1 gulung	Merk Klinpak
28	Plastik <i>wrap</i>	1 gulung	Merk Klinpak
29	Solatip	1 buah	-
30	Kertas label	2 bungkus	-
31	Spidol marker	1 buah	Merk Faber-Castell
32	Kain lap	1 buah	-
33	Termos air panas	1 buah	-
34	Parafilm	Secukupnya	-
35	Kamera digital	1 unit	Merk Olympus
36	Sarung tangan karet	Secukupnya	Merk Sensi gloves
37	Mikroskop binokuler	1 unit	Merk Shimadzu

No	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
38	Inkubator	1 unit	Merk Gallenkamp
39	Lemari pendingin	1 unit	Merk Electrolux
40	<i>Microwave</i>	1 unit	Merk Electrolux
41	<i>Autoclave</i>	1 unit	Merk Hirayama Mode HC36At
42	<i>Microflow Laminar</i>	1 unit	eRman
43	<i>Water bath</i>	1 unit	Merk Sibata
44	<i>Shaker Water bath</i>	1 unit	Merk Eyela
45	<i>Vortex</i>	1 unit	Merk Sibata
46	<i>Sentrifuge</i>	1 unit	Merk Hettich
47	Alat Elektroforesis gel Mini	1 unit	Bio-Rad
48	<i>High performance UV Transilluminator</i>	1 unit	UVP Upldan, CA
49	Mesin PCR	1 unit	Merk Eppendorf
50	Makropipet	1 buah	Merk-PIPETMAN
51	Mikropipet 1-10 μ l	1 buah	Merk Socorex
52	Mikropipet 20-200 μ l	1 buah	Merk Socorex
53	Tips 1 μ l	Secukupnya	Extragene
54	Tips 5 μ l	Secukupnya	Extragene
55	Tips 10 μ l	Secukupnya	Extragene
56	Tabung mikrosentrifuga	Secukupnya	Extragene
57	Tabung PCR	Secukupnya	Extragene
58	Corong Buhner	2 buah	-
59	Aspirator	1 unit	-

Tabel 3.2 Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian

No	Nama bahan	Jumlah
1	Spiritus	Secukupnya
2	Medium PDA	Secukupnya
3	Medium PDB	Secukupnya
4	Aquades	5 liter
5	ddH ₂ O	8 liter
6	<i>Ethanol absolute</i>	500 ml
7	<i>Ethanol 70 %</i>	1 liter
8	Nitrogen cair	Secukupnya
9	<i>Nucleic lysis solution</i>	8 ml
10	<i>RNAse</i>	20 µl
11	<i>Protein precipitation solution</i>	4 ml
12	<i>Isopropanol</i>	12 ml
13	<i>DNA rehydration solution</i>	600 µl
14	<i>Agarose</i>	Secukupnya
15	TAE (<i>Tris- Acetate-EDTA</i>)	Secukupnya
16	<i>Loading dye</i>	80 µl
17	<i>Ethidium bromide</i>	Secukupnya
18	<i>Primer NS-1(Forward)</i>	40 µl
19	<i>Primer NS-8 (Reverse)</i>	40 µl

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian meliputi pengecekan alat dan pembuatan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Peralatan yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Kemudian dilakukan pembuatan medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) sebagai media tumbuh bagi fungi isolat RY yang akan dikultur dan pembuatan ethanol 70% untuk isolasi DNA. Alat yang dibutuhkan kemudian dibungkus dengan kertas lalu alat dan medium PDA yang telah dibuat dimasukan ke dalam plastik tahan panas untuk kemudian disterilisasi panas lembap pada *autoclave* selama 15-20 menit dengan suhu 121° C dan tekanan 15 lbs.

2. Tahapan Penelitian

a. Pengkulturan Fungi Isolat RY

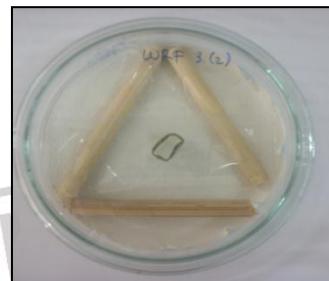
Lima isolat fungi RY yang didapat dari hutan Kalimantan disubkultur pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah steril. Pengkulturan dilakukan secara aseptik dengan menggunakan lup inokulasi didalam *laminar flow kabinet*. Fungi yang telah dikultur selanjutnya digunakan untuk identifikasi morfologi. Selain itu, fungi ini juga dikultur pada medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) untuk kemudian digunakan dalam isolasi DNA.

b. Identifikasi Morfologi Fungi Isolat RY

1) Pembuatan Slide Culture

Tahapan pertama dalam mengidentifikasi morfologi fungi adalah pembuatan *slide culture* (Gambar 3.1). *Slide culture* dibuat dengan menggunakan *objek glass* yang berada di atas segitiga sumpit yang beralaskan kertas saring. *Slide culture* yang kosong kemudian disterilisasi. Selanjutnya isolat RY yang akan diamati dikultur pada potongan agar yang diletakan pada *objek glass* yang kemudian ditutup dengan menggunakan *cover glass*. Lalu untuk memberi lingkungan

yang lembap maka aquades steril diteteskan pada kertas saring. *Slide Culture* yang berisi fungi isolat RY kemudian diinkubasi selama 3-4 hari di suhu ruangan (27°C).



Gambar 3.1 Slide culture

2) Pengamatan Fungi

Fungi yang telah tumbuh pada *slide culture* kemudian diamati dibawah mikroskop. Pengamatan yang dilakukan meliputi, bentuk hifa, sekat pada hifa, bentuk konidia, bentuk konidiofor, dan bentuk *phialide*. Selain itu juga dilakukan pengamatan secara makroskopis yang meliputi karakteristik warna dan bentuk koloni.

3) Identifikasi Morfologi

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis maka dilakukan penyesuaian terhadap ciri-ciri morfologi yang didapatkan dengan beberapa jenis fungi yang ada di buku “*Illustrated Genera of Imperfect Fungi*” (Barnett, 1960) dan “*A Manual of Soil Fungi*” (Gilman, 1975) maupun sumber lain yang mendukung.

c. Identifikasi Molekuler Fungi Isolat RY

1) Isolasi DNA Fungi Isolat RY

Sebelum dilakukan isolasi DNA, sampel fungi dipisahkan terlebih dahulu dari medium PDB dengan menggunakan aspirator. Isolasi DNA fungi (isolat RY) dilakukan dengan menggunakan *Wizard Genomic DNA purification Kit* (PROMEGA). Langkah kerja dilakukan

sesuai dengan instruksi manufaktur PROMEGA. Pertama, sejumlah miselia fungi dipindahkan secara aseptik kedalam mortar, lalu sejumlah nitrogen cair ditambahkan kedalam mortar. Selanjutnya miselia fungi yang telah dibasahi oleh nitrogen cair ditumbuk hingga menjadi bubuk. Bubuk miselia yang didapatkan lalu dipindahkan kedalam tabung mikrosentrifuga yang berisi 400 μl *nucleic lysis solution*. Kemudian tabung tersebut di vortex selama 3 detik untuk membasahi jaringan. Setelah itu tabung diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 65°C selama 15 menit. Kemudian 1 μl *RNAse* ditambahkan kedalam tabung dan dicampurkan dengan cara dibolak balik sebanyak 2-5 kali. Tabung tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Kemudian 200 μl *protein precipitation solution* ditambahkan kedalam tabung dan vortex selama 20 detik untuk selanjutnya disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Protein yang telah terpresipitasi akan membentuk pelet. Kemudian supernatan yang mengandung DNA dipindahkan dengan hati-hati kedalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml baru yang berisi 600 μl *isopropanol*, lalu tabung dibolak-balik sampai benang DNanya terlihat. Tabung kemudian disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu supernatannya dibuang, dan 600 μl ethanol 70% ditambahkan kedalam tabung yang berisi pelet DNA. Tabung kemudian dibolak-balik beberapa kali, hal ini dilakukan untuk mencuci DNA. Lalu tabung disentrifuge kembali pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang didapatkan lalu dibuang, dan pelet DNA yang berada didasar tabung dikeringkan dengan menaruhnya secara terbalik diatas kertas *tissue* yang bersih. Setelah kering, 100 μl *DNA rehydration solution* ditambahkan kedalam tabung yang berisi pelet DNA. DNA kemudian di rehydrasi kembali dengan menginkubasi tabung tersebut pada *waterbath* dengan suhu 65°C selama 30 menit. Selama diinkubasi pada

waterbath 65°C tabung dibolak-balik sesekali untuk mencampurkan DNA dengan larutannya.

2) Elektroforesis gel agarose

Hasil Isolasi DNA fungi (isolat RY) dianalisis dengan menggunakan elektroforesis *gel agarose* 1%. Pertama, 0,2 gr bubuk agarose dilarutkan dalam 20 ml buffer TAE (*Tris- Acetate-EDTA*) 1x yang berada dalam botol duran. Larutan tersebut dihomogenkan dengan cara dikocok pelan dan kemudian dipanaskan didalam microwave selama 1 menit untuk melarutkan agarose didalamnya. Larutan kemudian didiamkan disuhu ruangan sekitar 5 menit (sampai panas-panas kuku). Lalu larutan dituangkan dengan perlahan kedalam tray yang telah dipasangi sisir elektroforesis dan gelembung dibuang kesisi menggunakan tips. Agarose dibiarkan mengeras sekitar 30 menit dan sisir kemudian dicabut, lalu gel agarose diletakan di tank elektroforesis. Kemudian 1 μ l DNA dicampur terlebih dahulu dengan 4 μ l *loading buffer*. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit pada tegangan 100 volt dengan *buffer* TAE 1x sebagai *running buffer*. Gel kemudian diwarnai dengan 0,5 μ g/ml *Ethidium bromida* selama 2 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Hasil elektroforesis dilihat dibawah sinar UV pada panjang gelombang 312 nm dan difoto dengan menggunakan kamera digital.

3) Amplifikasi dengan PCR

Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan *universal primer* untuk 18S. Primer tersebut adalah *primer forward* NS-1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') dengan berat molekul 5785 dan *primer reverse* NS-8 (5'-TCC GCA CGT TCA CCT ACG GA-3') dengan berat molekul 6078. Sementara itu total volume reaksi yang digunakan adalah 40 μ l dengan komponen yang berisi 10 x *buffer* PCR (4 μ l), dNTP (4 μ l), *primer forward* (2 μ l), *primer*

reverse (2 μ l), DNA *template* (2 μ l), *Taq polymerase* (1 μ l), *distilled water* (25 μ l) (Hidayah, 2012). Campuran reaksi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *thermocycler* dengan tahapan reaksi yang dijelaskan pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Tahapan reaksi PCR gen 18S rRNA

Tahapan reaksi	Temperatur	Waktu	Jumlah Siklus
Pre-denaturasi	94°C	3 menit	1
Denaturasi	94°C	30 detik	25
Annealing	55°C	30 detik	25
Extension	72°C	2 menit	25
Post- extension	72°C	10 menit	1
Penyimpanan	4 °C	∞	1

4) Elektroforesis gel agarose

Hasil PCR yang didapat kemudian dielektroforesis kembali dengan cara yang sama seperti sebelumnya.

5) Sikuensing DNA

Produk PCR dari gen 18S rRNA kemudian dianalisis untuk mengetahui susunan nukleotida dari fragmen DNA yang didapatkan. Proses sikuensing DNA dilakukan dengan menggunakan mesin sequencer *BigDye Applied Biosystem* model 3730 yang dilakukan di Macrogen inc., Korea.

6) Analisis Data dengan Bioinformatika

Sikuen gen 18S rRNA yang telah didapatkan kemudian dibandingkan dengan sikuen DNA yang berasal dari Bank Gen (NCBI) menggunakan *software* BLASTn, setelah itu dilakukan proses *alignment* dengan menggunakan *software* Clustal X. Pohon filogenetik kemudian dibentuk dengan menggunakan *software* MEGA versi 5.



F. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada gambar 3.2 yang tertera dibawah ini:

