

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian deskriptif. Menurut Hartoto (2009) penelitian deskriptif merupakan metode penelitian yang berusaha menggambarkan dan menginterpretasi objek sesuai dengan apa adanya. Penelitian deskriptif pada umumnya dilakukan dengan tujuan utama, yaitu menggambarkan secara sistematis fakta dan karakteristik objek dan subjek yang diteliti secara tepat.

B. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak lima isolat fungi dengan kode isolat M. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat fungi yang ditumbuhkan dari limbah pewarna sintetik. Sampel fungi diperoleh dari hutan Samarinda, Kalimantan Timur yang merupakan hasil isolasi dan diketahui dapat mendegradasi pewarna sintetik (Hadibarata, 2011). Hutan tempat pengambilan sampel fungi tersebut merupakan hutan yang dekat dengan pemukiman masyarakat dan dekat dengan limbah industri tekstil.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Januari 2013 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Struktur tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 299 Bandung.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan 3.2

Tabel 3.1 Alat yang diperlukan dalam penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Alat Elektroforesis gel	1 unit	Biorad
2.	<i>Aluminium Foil</i>	1 gulung	Merk Klinpak
3.	<i>Autoclave</i>	1 buah	Merk Hirayama Mode HC36At
4.	Batang pengaduk	2 buah	P = 29,5 cm
5.	Botol reagen	20 buah	Duran
6.	Cawan Petri	30 buah	Pyrex
7.	<i>Cover glass</i>	60 buah	Sail brand
8.	Gelas ukur 50 mL	1 buah	Pyrex
9.	Gelas ukur 100 mL	1 buah	Pyrex
10.	Gelas ukur 250 mL	1 buah	Pyrex
11.	<i>High performance UV Transilluminator</i>	1 unit	UVP Upldan, CA
12.	<i>Hot plate dan Magnetic stirrer</i>	1 unit	Merk EYELA, RSCH-3
13.	<i>Incubator</i>	1 unit	Merk Gallenkamp
14.	Jarum ose	5 buah	-
15.	Kamera Digital	1 buah	Merk Sony Cybershot DSC W690
16.	Kapas	2 bungkus	-
17.	Kain kassa	5 bungkus	-
18.	Kertas saring	1 pak	Whatman No.1
19.	Kertas Label	2 bungkus	-
20.	<i>Laminar Air Flow</i>	1 unit	Shimadzu SCB-1000A
21.	Lampu spirtus	1 buah	-
22.	Lemari pendingin	1 unit	Merk Electrolux
23.	Lup inokulasi	2 buah	P = 22,5 cm; = 5 mm
24.	Makropipet	1 buah	Merk-PIPETMAN
25.	Mesin PCR	1 unit	Eppendorf,Mastercycer

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
26.	<i>Microwave</i>	1 unit	Merk Electrolux
27.	Mikropipet 1 μ l	1 buah	Merk Socorex
28.	Mikropipet 10 μ l	1 buah	Merk Socorex
29.	Mikropipet 5 μ l	1 buah	Merk Socorex
30.	Mikroskop binokuler	1 unit	Merk Shimadzu
31.	Mortar dan alu	5 buah	-
32.	<i>Object glass</i>	30 buah	Sail brand
33.	Pipet	2 buah	-
34.	Plastik Tahan Panas	5 pak	Merk Diamond
35.	Plastik wrap	1 gulung	Merk Klinpak
36.	Rak tabung	3 buah	-
37.	Spatula	5 buah	
38.	Spektrofotometer	1 unit	Genesis, Thermo scientific
39.	Spidol Marker	2 buah	Merk Snowman
40.	Tabung mikrosentrifugasi	75 buah	-
41.	Tabung reaksi	50 buah	<i>Pyrex</i>
42.	Timbangan Analitik	1 unit	Merk AND, HF 300
43.	Tips 1 μ l	Secukupnya	Extragene
44.	Tips 10 μ l	Secukupnya	Extragene
45.	Tips 5 μ l	Secukupnya	Extragene
46.	<i>Tissue</i>	1 pak	Merk Paseo
47.	<i>Vorteks</i>	1 unit	Merk SIBATA
48.	<i>Waterbath shaker</i>	1 unit	UNI <i>Thermoshaker</i> NTS-1300
49.	<i>Shaker</i>	1 unit	Merk EYELA
50.	Gelas Arloji kecil	1 buah	-
51.	Corong Buhner	5 buah	-
52.	Aspirator	1 buah	-
53.	<i>Sentrifuge</i>	1 unit	Merk Hettich
54.	Termos air panas	1 buah	-
55.	Sarung tangan karet	Secukupnya	Merk sensi gloves

Hana Gardenia Mahbubah, 2013

Identifikasi Morfologi Dan Molekuler Fungi (Isolat M) Yang Dapat Mendegradasi Pewarna Sintetik
 Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Tabel 3.2 Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	<i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	50 gram
2.	Alkohol absolut dan alkohol 70%	1 liter
3.	ddH ₂ O	2 liter
4.	Aquades	5 liter
5.	Alkohol 96%	0.5 liter
6.	<i>Ethidium Bromide</i>	40 µl
7.	Gel Agarose (FERMENTAS)	0,6 gram
8.	Nitrogen cair	500 ml
9.	<i>Nucleic lysis solution</i>	8 ml
10.	<i>RNase solution</i>	20 µl
11.	<i>Protein precipitation solution</i>	4 ml
12.	<i>Isopropanol</i>	12 ml
13.	<i>Ethanol 70 %</i>	1 liter
14.	<i>DNA rehydration solution</i>	600 µl
15.	<i>Loading dye</i>	80 µl
16.	Buffer TAE (<i>Tris-Acetate-EDTA</i>)	1 ml
17.	<i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB)	500 ml
18.	DNA Ladder 1 kb	20 µl
19.	Primer NS-1(<i>Forward</i>)	40 µl
20.	Primer NS-8 (<i>Reverse</i>)	40 µl

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Penelitian

a. Pembuatan medium sebagai Media Tumbuh Fungi Isolat M

Medium yang digunakan adalah medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan PDB (*Potato Dextrose Broth*). Alat-alat yang terbuat dari kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah dimasukkan ke dalam plastik untuk dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan kedalam *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121° C dan tekanan 1.5 atm.

b. Kultivasi Fungi Isolat M

Semua alat dan bahan yang akan digunakan disimpan dalam *laminar air flow* dengan disinari sinar UV terlebih dahulu selama 15 menit. Kemudian sebanyak lima isolat fungi yang didapat di subkultur dan ditumbuhkan kembali dalam medium PDA miring dan PDA pada cawan Petri, setiap isolat fungi diinkubasi pada suhu ruang.

Untuk isolasi DNA fungi isolat M, Sampel fungi di inokulasi pada medium PDB kemudian diinkubasi pada suhu kamar dan di *shaker* selama lima hari untuk pertumbuhan optimal. Kultur fungi tersebut kemudian digunakan untuk ekstraksi DNA fungi (Hidayah, 2012).

2. Tahap Penelitian

Identifikasi fungi yang dapat mendegradasi pewarna sintetik (isolat M) dilakukan secara morfologi dan molekuler.

1) Identifikasi Morfologi Fungi Isolat M

a. Pembuatan *Slide Culture*

Membuat medium PDA yang dilarutkan dalam 50 ml aquades, kemudian menyiapkan sebuah cawan Petri steril kosong untuk membuat agar, dan menyiapkan sebuah cawan Petri steril yang di dalamnya telah berisi kertas saring steril yang dipotong bundar, pada cawan Petri tersebut disimpan batang penahan berbentuk segitiga yang terbuat dari kayu ataupun sejenisnya, dan di atas batang penahan tersebut diletakkan sebuah *object glass* steril beserta *cover*

glass steril. Tahap dalam pembuatan *slide culture* yaitu, medium PDA yang telah dibuat, dituangkan ke dalam cawan Petri kosong dengan ketebalan agar satu sentimeter, kemudian menunggu hingga agar benar-benar menjadi padat, setelah agar padat blok agar steril kira-kira berukuran satu sentimeter kuadrat dipotong dari medium PDA dalam cawan Petri dan diletakkan di atas *object glass* dengan menggunakan pisau steril atau dengan spatula. Inokulasi fungi dilakukan pada agar yang disimpan di atas *object glass*, agar yang telah diinokulasi tersebut ditutup dengan *cover glass*, lalu menuangkan aquades secukupnya pada kertas saring yang berbentuk bundar. *Slide culture* tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang, setelah beberapa hari diinkubasi *slide culture* tersebut dapat diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x, kemudian diidentifikasi (Hamdiyati, 2010).

b. Identifikasi Morfologi Fungi

Identifikasi lima isolat fungi M dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama yaitu, pengamatan fungi secara makroskopis meliputi pengamatan terhadap warna dan bentuk koloni. Tahap kedua yaitu, pengamatan secara mikroskopis yang dilakukan setelah fungi ditumbuhkan pada *slide culture* dalam suhu ruang meliputi pengamatan terhadap hifa atau miselium dilihat dari spora, bentuk hifa, dan ada tidaknya sekat pada hifa (Hamdiyati, 2010). Identifikasi morfologi dilakukan sampai tingkat taksa genus menggunakan mikroskop binokuler. Lima isolat fungi M yang didapatkan dibandingkan dengan menggunakan buku panduan identifikasi *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Barnett, 1960), dan *A Manual of Soil Fungi* (Gilman, 1975), serta sumber lain yang mendukung.

2) Identifikasi Molekuler Fungi Isolat M

a. Ekstraksi DNA Fungi

Genom DNA fungi di ekstraksi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA). Sebanyak 400 µl *nucleic lysis solution* ditambahkan ke dalam tabung ependorf, kemudian kultur fungi dari medium PDB disimpan dalam mortar. Nitrogen cair ditambahkan ke dalam mortar yang

telah berisi kultur fungi dan di tumbuk hingga menjadi bubuk. Kemudian bubuk tersebut dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml yang telah berisi larutan *nucleic lysis solution* dan di vortex untuk membasahkan jaringan, kemudian tabung diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 65⁰C selama 15 menit. Sebanyak 3 µl *RNase solution* ditambahkan untuk melisis dinding sel dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik sebanyak 3-5 kali, kemudian setelah homogen, tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 15 menit. Tabung mikrosentrifugasi tersebut di simpan pada suhu ruang selama 5 menit, selanjutnya menambahkan *protein precipitation solution* sebanyak 200 µl dan di vortex dengan kecepatan tinggi selama 20 detik. Kemudian di sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 13000 rpm.

Setelah di sentrifugasi pada tabung ependorf akan terbentuk dua fasa, yaitu fasa atas dan bawah. Kemudian fasa atas (supernatan yang mengandung DNA) diambil dengan ujung tips yang steril, lalu dipindahkan ke tabung ependorf yang baru yang mengandung 600 µl *isopropanol*. Setelah larutan tercampur akan menghasilkan untai benang DNA yang membentuk suatu massa yang terlihat. Larutan tersebut di sentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit pada temperatur ruang. Selanjutnya supernatan dibuang, dan *pellet* (DNA) yang dihasilkan ditambahkan 600µl ethanol 70% dan dihomogenkan dengan cara dibolak balik untuk mencuci DNA. Kemudian di sentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13000 rpm. Ethanol kemudian dibuang menggunakan pipet. Tabung mikrosentrifugasi dibalik dan disimpan diatas tissue untuk mengeringkan pellet selama 15 menit. Sebanyak 30 µl *DNA rehydration solution* ditambahkan dan diinkubasi pada suhu 65⁰C selama 30 menit, kemudian disimpan pada suhu 2-8⁰C (Hidayah, 2012).

b. Elektroforesis Gel Agarose

Hasil isolasi genom DNA fungi dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Untuk melakukan proses elektroforesis, terlebih dahulu menyiapkan *tray* atau cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Posisi cetakan harus dipastikan telah berada pada bidang datar dengan menggunakan

waterpass. *Gel agarose* dibuat dengan konsentrasi 1% dibuat dari 0,25 g bubuk *agarose* dilarutkan dalam $1 \times$ TAE (*Tris Asetat-EDTA*) sebagai larutan penyangga sebanyak 25 ml hingga larut. Kemudian, larutan dipanaskan dalam *microwave* selama 1 menit untuk melarutkan bubuk *agarose*. Kemudian *gel agarose* didiamkan hingga hangat-hangat kuku lalu dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*). Sisir dipasang dengan posisi tegak dan berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Selanjutnya gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang.

Gel dan cetakan direndam pada *buffer* TAE 1X pada kolom elektroforesis. Larutan sampel dari *freeze* diambil sebanyak 3-5 μ l, kemudian dicampurkan dengan 2 μ l *loading dye*. Sampel dimasukkan ke dalam sumur yang terdapat dalam gel pada kolom elektroforesis. Setelah sampel dimasukkan, kemudian dielektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit (Mahuku, 2004). Gel berisi DNA hasil elektroforesis diwarnai menggunakan larutan *Ethidium Bromide* (EtBr) dengan konsentrasi 0,5 μ g/ml selama 5 menit, kemudian dibilas dengan *deion water* steril untuk membuang kelebihan EtBr. Gel hasil elektroforesis dilihat dengan alat sinar UV (*UV transilluminator*), pada panjang gelombang 312 nm dan difoto dengan menggunakan kamera digital merek Sony CyberShot DSC-W690.

c. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

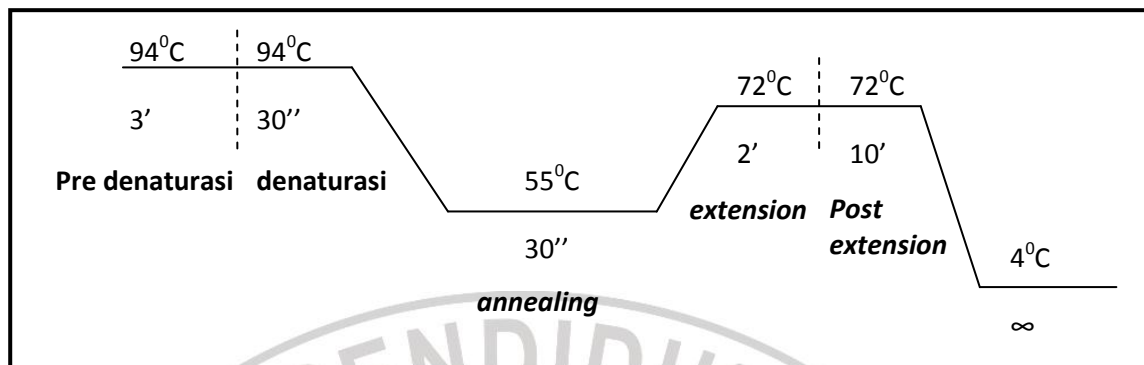
PCR didasarkan pada kemampuan polimerase DNA untuk mensintesis untai DNA komplementer baru dengan *template strand*. PCR memungkinkan untuk menghasilkan jutaan salinan dari urutan DNA tertentu. Proses PCR digunakan untuk amplifikasi DNA fungi. Ekstraksi genom DNA fungi di amplifikasi menggunakan *primer universal 18S rRNA*. Primer tersebut yaitu NS1 dan NS8, Noor Hidayah dalam Hadibarata *et al.*, 2012. Primer NS1 (5'-GTA GTC ATATGC TTG TCT C-3) dengan berat molekul 5785 dan NS8 (5'-TCC GCA CGT TCA CCT ACG GA-3) dengan berat molekul 6078.

Tabel 3.3 Komponen reaksi PCR (Hidayah, 2012)

PCR Mixture	Volume (μ l)
10x PCR buffer	4.0
Dntp	4.0
<i>Forward Primer</i>	2.0
<i>Reverse Primer</i>	2.0
<i>Genomic Template</i>	2.0
<i>i-Taq Polymerase</i>	1.0
<i>Distilled water</i>	25.0
Total	40

Tabel 3.4 Tahapan reaksi PCR gen 18S *r*RNA

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



Gambar 3.1 Profile PCR gen 18S *rRNA* (Hidayah, 2012)

d. Elektroforesis Gel Agorose

Gel agarose hasil PCR yang di dapat kemudian dielektroforesis kembali dengan cara yang sama seperti sebelumnya.

e. *Sequencing* DNA

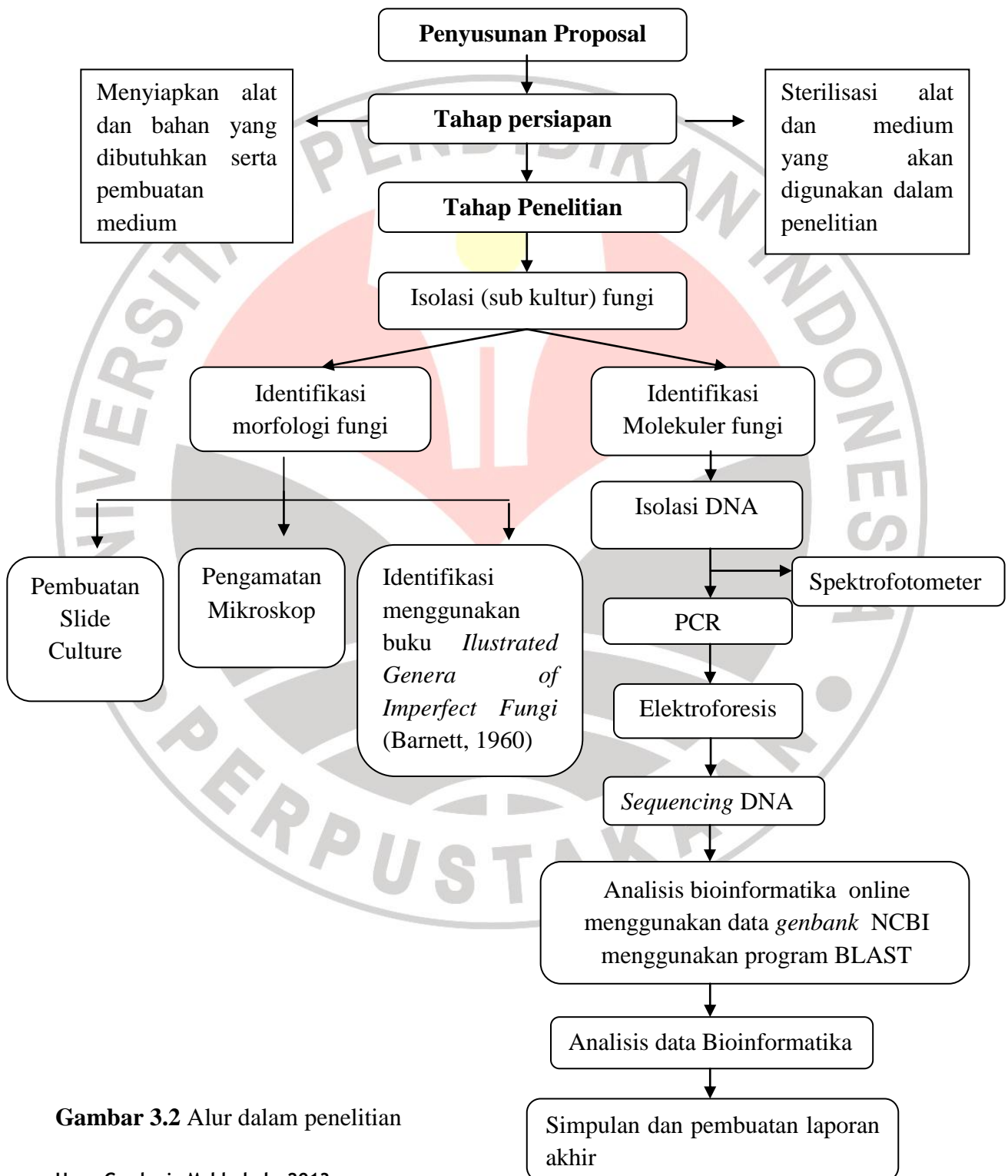
Proses *sequencing* DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *sequencer* *BigDye Applied Biosystem* model 3730 yang dilakukan di Macrogen inc., Korea.

f. Analisis Data Bioinformatika

Isolat fungi yang telah di subkultur, diidentifikasi sampai tingkat taksa Genus melalui analisis sikuen gen 18S *rRNA* menggunakan metode bioinformatika (BLAST) secara online. Setiap sikuen gen fungi yang didapat dari proses *sequencing* diterjemahkan terlebih dahulu menjadi kode nukleotida. Kemudian setiap sikuen nukleotida tersebut disejajarkan dan dibandingkan dengan data sikuen gen isolat fungi yang terdapat pada database Bank Gen NCBI (National Center for Biotechnology Information) di alamat website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>. Proses *alignment* dari setiap sikuen nukleotida gen isolat fungi menggunakan program tool multiple-sikuense *alignment* dari *software* Clustal X dan *software* MEGA (version 5) untuk menganalisis filogenetik fungi tersebut melalui pohon filogenetik yang dihasilkan.

3. ALUR PENELITIAN

Alur penelitian dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 3.2 Alur dalam penelitian

Hana Gardenia Mahbubah, 2013

Identifikasi Morfologi Dan Molekuler Fungi (Isolat M) Yang Dapat Mendegradasi Pewarna Sintetik
 Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu