BAB III
METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian dasar dengan metode deskriptif (Nazir, 1988).

B. Populasi dan sampel

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh bakteri endofit yang ada pada akar *Vetiveria zizanioides* L. yang ada di alam, sedangkan sampel yang digunakan adalah bakteri endofit yang ada pada akar *Vetiveria zizanioides* L. dari perkebunan Usar Kamojang, Kab. Garut.

C. Objek penelitian

Objek penelitian ini adalah materi genetik (DNA), terutama gen *Ketosynthase* (KS) dan *Nonribosomal Peptide Synthetase* (NRPS).

D. Tempat penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret 2013 sampai bulan September 2013 yang dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi FPMIPA UPI.

E. Cara kerja

1. Pengambilan sampel

Isolasi mikroba endofit dilakukan dengan mengambil sampel akar tanaman *Vetiveria zizanioides* L., kemudian akar yang didapat dicuci pada air mengalir hingga tanah yang menempel bersih, kurang lebih selama 5 menit. Setelah dicuci akar dipotong menggunakan *steril blade* atau gunting steril sepanjang 1,5 – 2 cm, akar yang telah dipotong kemudian dilakukan sterilisasi permukaan menggunakan larutan etanol 75% selama 1 menit, bayclin 25%

Fauzi Akhbar Anugrah, 2013
Analisis Metagenomik Gen Ketosynthase Dan Nonribosomal Peptide Synthase Pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanoides*, L.
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

selama 5 menit, dan terakhir dicuci dengan etanol 75% selama 30 detik. Setelah disterilisasi permukaan, akar kemudian dipotong lebih halus dan dimasukan pada cairan fisiologis NaCl 0,98% pada tabung reaksi, kemudian divorteks selama 1,5 jam (Lumyong *et al.*, 2001).

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan mengambil 3 ml (@ 1,5 ml) larutan hasil vorteks pada tabung 1,5 ml, kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 2 menit. Bagian supernatan dibuang, kemudian proses isolasi DNA dari pellet dengan metode yang tersedia dalam katalog " FERMENTAS DNA Purification KIT". Pellet hasil sentrifugasi ditambahkan dengan 200 µl TE buffer diresuspensikan hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan 400 µl larutan *lysis solution*. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 65^{o}C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, kemudian ditambahkan 600 µl kloroform kedalam tabung dan dihomogenkan dengan dibolak-balik sebanyak 3-5 kali. Sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit, kemudian fasa cair dipindahkan pada tabung baru dan ditambahkan 800 µl larutan presipitasi (80 µl larutan presipitation solution dilarutkan dengan 720 µl ddH_2O steril) kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang hati-hati kemudian ditambahakan NaCl solution 1,2 M sebanyak 100 µl pastikan pellet DNA larut. Kemudian ditambahkan RNAse *free* DNAse sebanyak 10 µl lalu diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 300 µl etanol absolute dingin dan disimpan pada – 20^{o}C selama 1-2 jam. Selanjutnya disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit, cairan atas dibuang dengan hati-hati endapan DNA jangan sampai terbuang biarkan hingga mengering. Pellet yang terbentuk kemudian dilarutkan dengan ddH_2O steril sebanyak 20 µl, larutan tersebut disimpan pada -20^{o}C hingga siap digunakan.

3. PCR

Komposisi mix PCR untuk amplifikasi gen KS dan gen NRPS adalah dengan buffer enzim 10x Dream Taq Buffer sebanyak 5 µl hingga konsentrasi akhir 2,5 mM, dNTPs (mix) sebanyak 5 µl dengan konsentrasi akhir 0,2 mM tiap dNTP, enzim Dream Taq polimerase dengan konsentrasi akhir 1,25 u/µl (Sambrook dan Russel, 2001). Amplifikasi menggunakan primer DKF/DKR (untuk *Ketosynthase*), dan MTF/MTR (untuk NRPS) masing-masing 2,5 µl, dan di tambahkan ddH2O hingga 25 µl. Tabung PCR dimasukan kedalam mesin PCR Thermocycler (Eppendorf) yang di program untuk tahap pre-denaturasi pada suhu 95^{o}C selama 5 menit, tahap denaturasi pada suhu 94^{o}C selama 1 menit, annealing untuk primer MTR/MTF dan DK/DKR pada suhu 50^{o}C (Zheng *et al.,* 2008; Li *et al.,* 2009) dan 51^{o}C, ekstensi pada suhu 72^{o}C selama 1 menit, tahan ekstensi akhir selama 72^{o}C selama 7 menit dan diinkubasi pada suhu 4^{o}C. Reaksi amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus untuk KS dan 35 siklus untuk NRPS. Amplikon kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1 % dalam buffer TBE 0,5x untuk melihat kualitas hasil amplifikasi (Moffit & Neilan, 2003).

4. Elektroforesis hasil PCR

Elektroforesis dilakukan secara horizontal pada agarose 1% dengan tegangan 75 volt selama 40 menit dalam larutan TAE 1x/TBE 0,5x. Alat yang digunakan adalah alat elektroforesis BIORAD. Gel berisi DNA hasil elektroforesis direndam dengan *Ethidium Bromide* (EtBr) selama lima menit, kemudian dibilas dengan aquadest selama 3 menit. Agar-agar yang telah direndam dalam EtBr kemudian dilihat dan diamati pada UV transluminator.

5. Purifikasi hasil PCR

Proses purifikasi dilakukan dengan metode sentrifugasi, amplikon atau potongan gel agarose yang mengandung gen yang dimaksud kemudian dipotong dan dilakukan proses purifikasi berdasarkan protokol yang tersedia

pada katalog Wizard SV Gel and PCR *Clean-Up System* (Promega, USA). Diambil ±300 µl gel kedalam tabung 1,5 ml, selanjutnya ditambahkan *membrane binding solution* dengan perbandingan berat gel 1:1, campuran divortex dan diinkubasi pada suhu 60^{o}C hingga potongan gel terlarut semua. Tabung disentrifugasi secara singkat untuk memastikan DNA berada pada bagian dasar tabung. Masing-masing SV minicolumb diambil dan diletakan pada tabung koleksi kemudian larutan pertama dimasukan pada tabung filter dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu kamar untuk selanjutnya disentrifugasi pada keceptan 14.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang berada pada tabung koleksi dibuang, kemudian SV minicolumb dikembalikan pada tabung koleksi, dan ditambahkan 700 µl *membrane wash solution* untuk disentrifugasi kembali pada 14.000 rpm selama 1 menit dan mengulangi ditambahkan lagi 500 µl *membrane wash solution*. Kembali sentrifugasi SV minicolumb dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Kosongkan tabung koleksi dan sentrifugasi SV minicolumb bersama tabung koleksi dalam keadaan kosong pada kecepatan yang sama selama 1 menit untuk menguapkan residu etanol. Selanjutnya tabung SV minicolumb dipindahkan pada tabung eppendorf yang baru untuk ditambahkan 50 µl *nuclease free water*, disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 1 menit, hasil purifikasi disimpan pada suhu -20^{o}C.

6. Kloning gen KS dan NRPS pada vektor

Amplikon hasil PCR diklonkan pada plasmid pGEM-T Easy vector (Promega, USA) dengan bantuan enzim ligase. 2x Rapid Ligation Buffer T4 Ligase 5 µl, pGEM-T Easy vector (50 ng) 1 µl, Amplikon 2 µl, T4 DNA Ligase 1 µl, dan ddH2O hingga 10 µl kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37^{o}C atau semalaman (16 jam) pada suhu 4^{o}C.

7. Transformasi

Untuk transformasi sel yang digunakan merupakan sel kompeten *E.coli* DH5α yang telah diberi perlakuan $CaCl_2$ dingin, kemudian dipindahkan 50 µl/ 100 µl sel kompeten ke tabung steril dingin dengan menggunakan mikropipet. Tambahkan DNA (50 ng) 2 µl hasil kloning DNA atau 0,1 µl kontrol *uncut* ke setiap tabung. Campurkan isi tabung dengan membolak-balikan tabung perlahan. Tabung disimpan dalam es selama 20 menit. Tabung dipindahkan pada rak *waterbath* dengan suhu tepat 42^{o}C selama 45-50 detik, jangan digoyang. Pindahkan tabung dengan cepat pada es agar sel menjadi dingin selama 2 menit. Tambahkan 950 µl medium SOC atau 900 µl pada tabung kontrol. Inkubasi kultur selama 45 menit dalam water bath suhu 37^{o}C agar bakteri dapat pulih dan mengekspresikan penanda resistensi antibiotik yang dikodekan oleh vektor plasmid. Sebanyak 100 µl sel ditumbuhkan dan kemudian diikuti seleksi biru-putih pada medium LBA yang telah dibubuhi ampicilin 100 µg/ml dan X-gal 40 µg/ml diinkubasi pada 37^{o}C selama 24 jam Berdirikan cawan dan inkubasi dapa suhu 37^{o}C. Untuk hasil maksimal simpan biakan dalam inkubator 4^{o}C pada 24 jam ke 2. Efisiensi transformasi dihitung berdasarkan instruksional KIT Promega dan pGEM-T Eassy yang mengacu pada (Sambrook & Russel, 2001).

8. Isolasi Plasmid

Untuk mengisolasi DNA hasil kloning dilakukan dengan *mini preparation*, yaitu dengan Lisis Alkali dan SDS (Sambrook & Russel, 2001). Plasmid diisolasi dari bakteri hasil transformasi dalam medium LB kemudian diinkubasi pada suhu 37^{o}C dengan shaker selama 16 jam. Selanjutnya diambil 1,5 ml larutan kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama 30 detik pada suhu 4^{o}C dalam sentrifuge. Kultur induk yang tidak dipakai disimpan pada suhu 4^{o}C. Pellet yang dihasilkan dari proses sentrifugasi tersebut diambil untuk isolasi plasmid dengan metode lysis dinding I menggunakan vortex. Selanjutnya menambahkan 200 µl pelarut alkaline lysis II yang masih baru ke masing-masing sespensi bakteri, kemudian tabung

ditutup rapat dan dihomogenkan dengan membolak-balikan tabung secara cepat sebanyak 5 kali (tidak di vortex). Kemudian simpan tabung diatas es, tambahkan 150 µl pelarut alkaline lysis III tabung didtutup kemudian mendispersikan larutan melalui kekentalan lisat bakteri dengan membalikan tabung beberapa kali. Tabung kembali dimasukan pada es selama 3-5 menit. Setelah itu disentrifugasi kembali pada kecepatan maksimum 13.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4^{o}C pada sentrifuge. Supernatant dipindahkan pada tabung baru, kemudian ditambahkan phenol : chloroform dengan perbandingan volume yang sama dengan volume supernatant, Mencampur materi organik (DNA) dan air dengan vortex, kemudian menyentrifugasi emulsi pada sentrifuge dengan kecepatan maksimum selama 2 menit pada suhu 4^{o}C. lapisan air yang terbentuk di bagian atas dipindahkan pada tabung baru. Kemudian dipresipitasi dengan menambahkan 2x volume etanol pada suhu ruang. Mencampur larutan dengan vortex, kemudian didiamkan selama 2 menit dengan cara memberdirikan tabung pada suhu kamar. Asam nukleat kemudian diendapkan dengan sentrifugasi dalam sentrifuge dengan kecepatan maksimum selama 5 manit pada suhu 4^{o}C. supernatant dibuang kemudian ditambahakan 1 ml etanol 70% ke pellet dalam tabung lalu membolak-balikan tabung beberapa kali, dan disentrifugasi kembali selama 2 menit, supernatant dibuang dan dikeringkan diatas tissue. DNA dilarutkan dalam 50 µl TE (pH 8,0) yang berisi 20 µl/ml DNAse – free RNAse. Vortex selama beberapa detik selanjutnya disimpan pada suhu -20^{o}C.

9. *Sequencing* DNA Plasmid Rekombinan

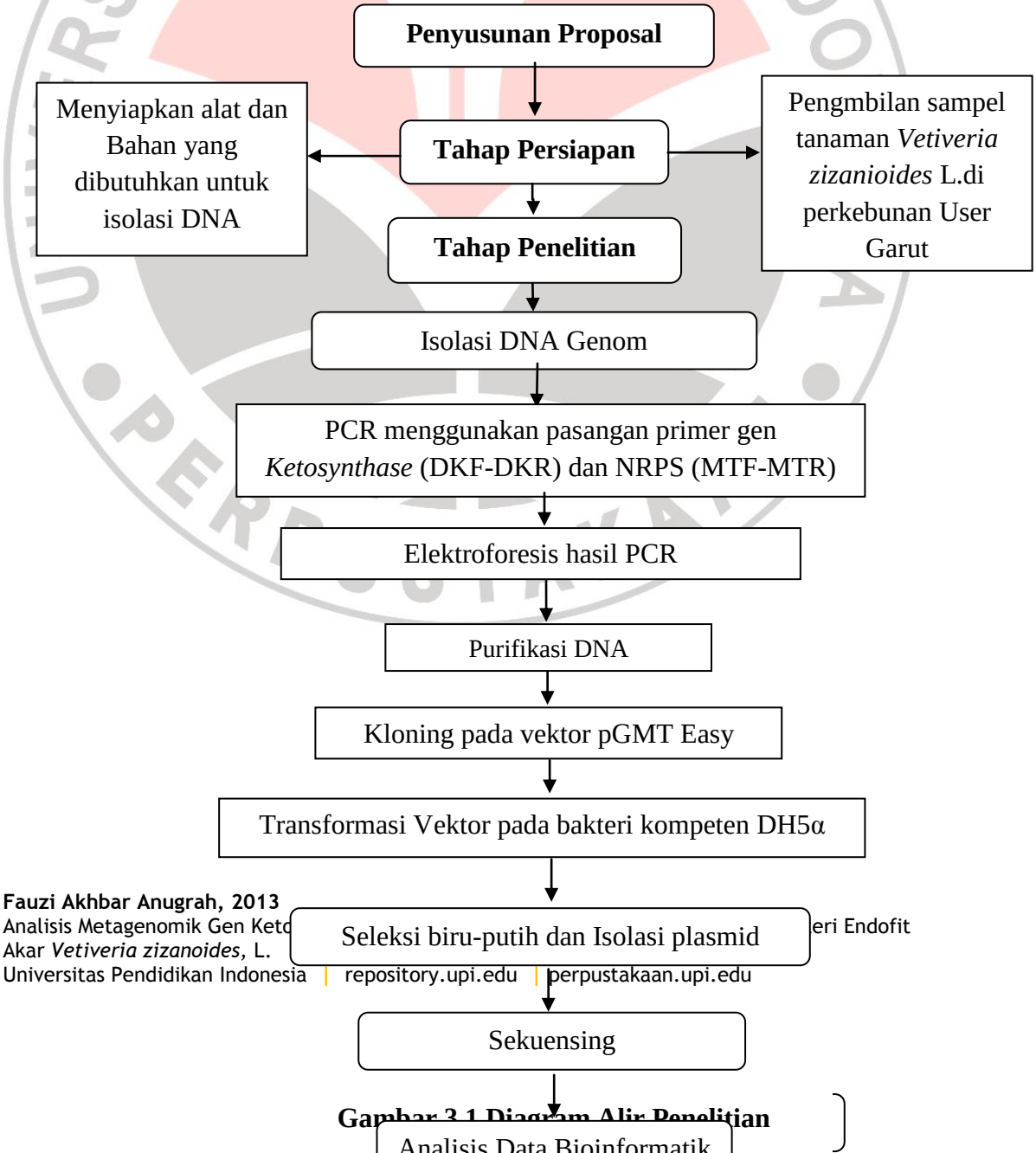
Proses *Sequencing* dilakukan dengan BigDye Applied Biosystem sequencer engine model 3730 pada Macrogen Inc. Korea, selanjutnya hasil *sequencing* dilakukan analisis bioinformatik.

10. Analisis Bioinformatik

Setiap sekuens gen KS dan NRPS yang didapatkan dari proses *sequencing* disejajarkan dan dibandingkan dengan data sekuens gen KS dan NRPS yang terdapat pada *data base Gene Bank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Proses blast dilakukan pada alamat *website* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi, selanjutnya *alignment* dari setiap sekuens gen KS dan NRPS menggunakan program *tool multiple-sequence alignment* dari *software Clustal X* dan *software* MEGA5 untuk melakuka analisis pohon filogenetik yang dihasilkan.

F. Alaur Penelitian

Adapun alur penelitian yang dilakukan sebagai berikut:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

Fauzi Akhbar Anugrah, 2013
Analisis Metagenomik Gen Keto eri Endofit Akar *Vetiveria zizanoides*, L.
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu