

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mendeskripsikan atau menggambarkan fenomena-fenomena yang ada. Dalam penelitian deskriptif tidak diberikan perlakuan-perlakuan terhadap variabel. Penelitian ini diawali dengan studi kepustakaan yang dilakukan pra-penelitian, penelitian sebenarnya dan analisis data (Nashir, 2003). Penelitian deskriptif ini tidak dicukupkan pada pengumpulan data, pengorganisasian, analisis dan penarikan intepretasi serta penyimpulan, tetapi dilanjutkan dengan perbandingan dan mencari kesamaan serta hubungan kasual dalam berbagai hal.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah hasil isolasi kapang endofit dari kulit batang *Taxus sumatrana* yang didapat dari Kebun Raya Cibodas, Bogor, Jawa Barat. Populasi dari penelitian ini adalah seluruh kapang endofit yang terdapat pada kulit batang tanaman *Taxus sumatrana*.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Desember sampai bulan Juli 2018. Pengambilan sampel dilakukan di Kebun Raya Cibodas, Bogor Jawa Barat. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Gedung FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Proses sekuensing sampel hasil amplifikasi DNA gen DBAT dari sampel-sampel yang positif dilakukan di Macrogen Inc., Seoul-Korea Selatan.

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Gedung FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia (Lampiran 1). Sampel dicuplik menggunakan pinset

dan pisau steril selanjutnya disimpan dalam *coolbox* menuju laboratorium. Etanol 70 %, natrium hipoklorit 5,3 %, dan etanol 75 % digunakan dalam proses sterilisasi permukaan kulit batang.

Medium yang digunakan untuk menumbuhkan kapang endofit dalam penelitian ini adalah M1D, S7 dan PDA dengan penambahan kloramfenikol sebagai antibakteri. Karakterisasi kapang dilakukan dengan pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* yang selanjutnya diamati menggunakan mikroskop binokuler (Zeiss AX10 Imager A2, Zeiss, German). DNA dari kapang-kapang terseleksi kemudian diuji kualitas dan kuantitasnya menggunakan spektrofotometri *UV-Vis Milton Roy Spectronic 20D*. Amplifikasi gen target dilakukan dalam mesin *thermal cycler Applied Biosystem, USA*. Amplikon DNA yang teramplifikasi divisualisasikan menggunakan alat elektroforesis *Bio-RadMini Sub Cell GT,CA USA*. Sekuensing dilakukan menggunakan mesin *Sequencer di Macrogen, Inc. Korea Selatan*. Seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian steril dari kontaminasi mikroba, pirogen dan zat kimia.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

1) Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan disiapkan dalam keadaan bersih dan kering selanjutnya dibungkus menggunakan plastik tahan panas untuk disterilisasi panas lembab menggunakan *autoclave* selama 15 menit dalam suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

2) Pengambilan Sampel

Bahan utama pada penelitian adalah tumbuhan *T. sumatrana* yang berasal dari Kebun Raya Cibodas Bogor. Sampel diambil dari 3 pohon *Taxus sumatrana* yang memiliki umur yang sama. Tanaman ini diambil dari bagian batang untuk diisolasi kapang endofitnya. Kulit batang *Taxus sumatrana* dicuplik pada bagian atas, tengah dan dekat tanah. Ukuran kulit batang yang dicuplik

7 x 3 cm dengan ketebalan 0,5 sampai 2 cm yang dipotong menggunakan pisau dan gunting steril. Sampel dicuplik menuju laboratorium dan disimpan dalam *coolbox* yang berisi es batu untuk menjaga kondisi sampel tetap utuh.

3.5.2 Tahap Penelitian

Prosedur penelitian dalam penelitian ini terdiri dari 13 tahap yaitu:

1) Pembuatan Media

Media tumbuh yang digunakan untuk isolasi kapang endofit yaitu menggunakan media M1D, S7, dan PDA. Setiap medium ditambah kloramfenikol 0,5 mg/mL dalam cawan petri untuk mencegah kontaminasi bakteri pada media.

2) Isolasi Kapang Endofit

Batang tanaman *T. sumatrana* dengan panjang 2 cm dan lebar 1 cm diambil dari pangkal, tengah dan ujung tanaman, dicuci dengan air mengalir, lalu dicelupkan berturut-turut ke dalam etanol 70 % selama 1 menit, natrium hipoklorit 5,3 % selama 5 menit, dan etanol 75 % selama 0,5 menit. Di dalam laminar, bagian batang dibelah dua secara longitudinal, lalu diletakkan di atas cawan Petri berisi Media M1D, S7, dan PDA yang telah dicampur dengan kloramfenikol 0,05 mg/mL, selanjutnya diinkubasi selama 3 hari pada suhu 25°C. Setelah 3 hari koloni yang tumbuh dipindahkan ke Media M1D, S7, dan PDA baru untuk diinkubasi kembali pada temperatur yang sama. Pengecekan koloni baru dilakukan setiap 24 jam untuk pemurnian lebih lanjut (Croizer, dkk. 2006).

3) Pemurnian Kapang Endofit

Kapang yang tumbuh pada belahan kulit batang selama proses inkubasi, dimurnikan dengan propagasi koloni yaitu memotong dan mentransfer secara aseptik sebagian miselium kapang ke dalam media kultur baru secara aseptik. Jamur yang

tumbuh dari selah sayatan kulit batang diambil dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipijarkan terlebih dahulu diatas api kemudian digoreskan ke media M1D, S7, dan PDA yang baru. Penggoresan dilakukan dengan menggunakan metode penggoresan (*strep*) dengan metode penggoresan bersinambungan dan pada media miring M1D, S7, dan PDA kemudian inkubasi pada suhu ruangan selama 3 sampai 5 hari.

Melakukan identifikasi isolat hasil isolasi berdasarkan ciri - ciri makroskopis dan mikroskopisnya dari morfologi koloni jamur dan karakteristik jamur spora selanjutnya dilakukan analisis filogenetik molekuler untuk mengidentifikasi genus dan spesies dari kapang yang terkultur (Xiong, dkk. 2013).

4) Karakterisasi Morfologi Kapang Endofit

Karakterisasi kapang endofit dilakukan dengan pengamatan karakter morfologi kapang. Pengamatan morfologi kapang menggunakan biakan kapang endofit umur lima hari dari hasil pemurnian. Pengamatan morfologi kapang meliputi warna dan permukaan koloni, garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni, dan lingkaran-lingkaran konsentris. Pengamatan mikroskopis preparat meliputi bentuk hifa, dan bentuk sel reproduksi seksual dan aseksualnya. Untuk mengamati morfologi mikroskopis kapang sebelumnya membuat preparat dengan pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* untuk mempertahankan struktur jamur, membersihkan jaringan serta memberikan pewarnaan biru pada spora jamur dan hifa untuk memudahkan pengamatan.

Setiap kapang dibuat sediaan mikroskopik dengan mengambil kapang menggunakan ose. Pada kaca objek ditetaskan *Lactophenol Cotton Blue*, kemudian ose digoyangkan ke dalam tetesan pewarna sampai menyebar. Sediaan dikeringkan selama 5 menit untuk kemudian diamatai dalam

perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop binokuler (Zeiss AX10 Imager A2, Zeiss, German). Karakteristik morfologi dari berbagai macam koloni kapang dicatat untuk proses karakterisasi.

5) Subkultur Kapang Endofit untuk Ekstraksi DNA

Isolat kapang yang telah diremajakan masing-masing diinokulasikan ke dalam tabung falcon berisi 25mL media PDB dalam 50 mL tabung falcon. Tiap tabung falcon dibiarkan pada suhu 25°C selama 72 jam (Fermentasi statis). Miselia yang tumbuh dipanen dengan sentrifugasi (13.000 rpm dalam waktu 5 menit). Miselia yang dipanen kemudian dicuci dengan ddH₂O dan disentrifuge kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit untuk diambil peletnya, ddH₂O kemudian dibuang dan miselia siap dipanen untuk isolasi DNA (Cenis, 1992).

6) Isolasi DNA Kapang Endofit

Optimasi ekstraksi DNA yang telah dilakukan berdasarkan berbagai modifikasi metode dari beberapa jurnal menghasilkan kemurnian dan konsentrasi DNA. Metode isolasi DNA yang akan digunakan untuk mengisolasi 20 sampel kapang endofit pada penelitian ini adalah berdasarkan pada metode Gupta dkk. (2013) yang telah dimodifikasi. Miselia hasil subkultur ditimbang sebanyak 200-300 mg untuk selanjutnya dihaluskan dengan mortal dan pestel steril dalam 100 µL buffer ekstraksi hingga menjadi pasta halus. Pasta miselia dimasukkan dalam 2 mL tabung eppendorf dengan penambahan 400 µL buffer ekstraksi. Campuran pasta misel dan buffer ekstraksi dihaluskan menggunakan mikropestel, campuran di vortex dan dipanaskan dalam *water bath* 65°C selama 60 menit. Ditambahkan 500 µL Na-asetat untuk selanjutnya diinkubasi dalam suhu -20 °C selama 15 menit.

Campuran divortex selama 5 menit dalam 13.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke *tube* baru dan ditambahkan isopropanol 500 μ L dan dibolak-balik tabungnya selama 1 menit untuk selanjutnya diikubasi dalam suhu -20°C selama 30 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet DNA dicuci dengan 500 μ L etanol 70% dan disentrifugasi 13.000 rpm selama 5 menit dan dikeringkan selama 5 menit pada suhu ruang. DNA yang terisolasi diresuspensi dengan 100 μ L TE dan disimpan dalam suhu -20°C .

7) Uji Kualitas dan Kuantitas DNA

Kuantitas dan kualitas DNA diukur menggunakan spektrofotometri *UV-Vis*. Pengujian kuantitas DNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm untuk menghitung kemurnian dan konsentrasi DNA. Pengujian kualitas DNA menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa (Facthiyah, 2011).

8) Optimasi Suhu PCR

Primer pengkode gen *10-deacetylbaaccatin III-10-acetyl transferase (DBAT)* untuk *penapisan* kapang endofit penghasil Taxol berdasarkan sequen dari gen DBAT adalah primer DBAT-F (5-GGGAGGGTGCTCTGTTG-3), dan DBAT-R (5-GTTA CCTGAACCACCAGAGG-3) yang didesain dan disintesis berdasarkan Zhang, dkk. (2008). Primer *DBAT* akan mengatalis formasi dari *baccatin III*, senyawa *immediete* prekursor diterpenoid dari Taxol (Croteau, 2006). Amplifikasi PCR menggunakan primer DBAT-F dan DBAT-R dilakukan dengan penambahan 20 μ l volume reaksi total. Tabung berisi 10pmol/ μ l dari setiap primer 2.5 μ l 10x PCR buffer, 0.4 mMol dNTP mix, 0.5 mM MgCl_2 , 2 unit *Taq* DNA polymerase dan 50 ng templet

DNA. Optimasi amplifikasi PCR dilakukan dalam *thermal cycler* dengan pemanasan 8 suhu annealing yang berbeda :

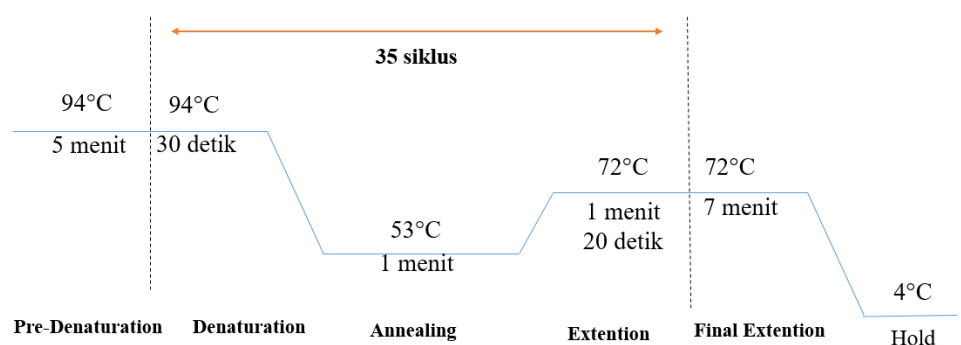
- a) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 47°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.
- b) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 50°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.
- c) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 51°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.
- d) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 53°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.
- e) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 54°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.
- f) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 55°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.
- g) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 56°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.

- h) Pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 57°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72 ° C selama 7 menit.

9) Amplifikasi PCR untuk Penapisan Taxol

Amplifikasi PCR menggunakan primer DBAT-F dan DBAT-R dilakukan dengan penambahan 25µl volume reaksi total. Tabung berisi 10pmol/µl dari setiap primer 2.5 µl 10x PCR buffer, 0.4 mMol dNTP mix, 0.5 mM MgCl₂, 2 unit *Taq* DNA polymerase dan 50 ng templet DNA. Optimasi PCR yang dilakukan menggunakan berbagai macam suhu annealing dalam *thermal cyclers* menghasilkan ampikon yang berbeda. Pita terbentuk pada satu suhu annealing yang tepat yaitu dengan pemanasan awal pada suhu 94°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 53°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit 20 detik, dan proses extention akhir pada suhu 72° C selama 7 menit.

Produk PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose (Xiong, dkk. 2013). Hasil dilihat dengan elektroforesis gel agarosa. Program suhu mesin *thermal cyclers* dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Skema Program PCR

10) Elektroforesis Gen DBAT

Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui ukuran pita DNA yang teramplifikasi. Proses elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1,5% dalam buffer TAE 1X sebagai pelarutnya. Gel agarose dilarutkan dengan cara dipanaskan dalam microwave selama 1 menit hingga gel homogen. Gel didinginkan disuhu ruang hingga hangat-hangat kuku dan ditambahkan EtBr untuk selanjutnya dituangkan kedalam cetakan agarose yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) sebagai cetakan sumur untuk memasukan sampel. Posisi sisir dipasang tegak berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Agarose dibiarkan mengeras dalam cetakan pada suhu ruang. Gel agarose selanjutnya direndam dalam TAE 1X pada kolom elektroforesis.

Gen DNA hasil amplifikasi dan ladder disiapkan. Genruler 1kb ThermoScientific dicampurkan dengan Loading Dye dan Nuclease free water sebagai marker untuk kemudian dimasukkan kedalam sumur gel pertama selanjutnya seluruh sampel dimasukan kedalam sumur secara berurutan. Running elektroforesis dilakukan pada daya 75 volt dan 400 A selama 40 menit. Gel yang telah dirunning kemudian diamati menggunakan lampu UV. Sampel yang memunculkan pita DNA berukuran 200bp dinyatakan positif dan masuk kedalam tahap penelitian selanjutnya.

11) Ligasi pada Vektor pGEM-T Easy

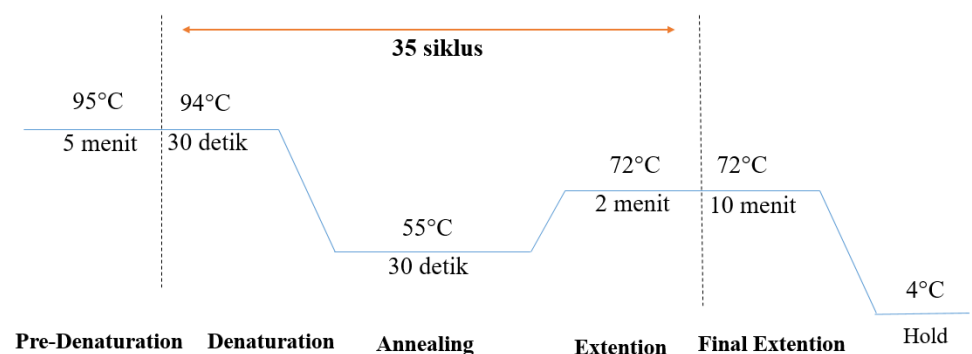
Pada penelitian ini ligasi dilakukan untuk memperpanjang ukuran gen pada proses sequencing. Proses ligasi akan dilakukan dengan menggunakan T4 DNA Ligase (Fermentas). Sebelum proses ligasi dilakukan, perhitungan terhadap perbandingan jumlah DNA insert dari sampel yang positif dan vektor harus diperhitungkan dengan perhitungan:

$$= \frac{kb \text{ insert}}{kb \text{ vektor}} \times ng \text{ vektor.}$$

Komposisi reaksi ligasi direaksikan berdasarkan petunjuk Buku Manual dari Promega. Masing-masing reaksi dicampurkan dalam tube 200 μ l. Proses pencampuran dilakukan dalam *Laminar Air Flow*. Setelah semua larutan berada dalam kondisi homogen, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama 16 jam dalam wadah tertutup dan gelap.

12) Amplifikasi PCR menggunakan primer M13

Amplifikasi PCR menggunakan primer M13 pada gen DBAT yang telah diinsersikan pada vector pGEM-T Easy ini akan menunjukkan pita pada ukuran 361 bp. Primer M13-F (5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3') dan primer M13-R (5'-GGAAACAGCTATGACCGTG-3') digunakan untuk mengamplifikasi gen target. Amplifikasi PCR dilakukan dengan mereaksikan komponen Master Mix k10181 DreamTaq™ Thermoscientific sesuai protokol. Campuran reaksi amplifikasi dimasukkan kedalam mesin *thermal cycler* dengan pemanasan awal pada suhu 95°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 55°C selama 30 detik, 72°C selama 2 menit, dan proses extention akhir pada suhu 72° C selama 10 menit. Program suhu mesin *thermal cycler* dapat dilihat pada **Gambar 3.2.**



Gambar 3.2. Skema Program PCR Ligasi

13) Elektroforesis Hasil Ligasi

Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui ukuran pita DNA yang teramplifikasi. Proses elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1,5% dalam buffer TAE 1X sebagai pelarutnya. Gel agarose dilarutkan dengan cara dipanaskan dalam microwave selama 1 menit hingga gel homogen. Gel didinginkan disuhu ruang hingga hangat-hangat kuku dan ditambahkan EtBr untuk selanjutnya dituangkan kedalam cetakan agarose yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) sebagai cetakan sumur untuk memasukan sampel. Posisi sisir dipasang tegak berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Agarose dibiarkan mengeras dalam cetakan pada suhu ruang. Gel agarose selanjutnya direndam dalam TAE 1X pada kolom elektroforesis.

Gen DNA hasil amplifikasi dan ladder disiapkan. Genruler 1kb Thermoscientific dicampurkan dengan *Loading Dye* dan *Nuclease free water* sebagai marker untuk kemudian dimasukkan kedalam sumur gel pertama selanjutnya seluruh sampel dimasukan kedalam sumur secara berurutan. Running elektroforesis dilakukan pada daya 75 volt dan 400 A selama 40 menit. Gel yang telah dirunning kemudian diamati menggunakan lampu UV. Sampel yang memunculkan pita DNA berukuran 316 bp selanjutnya disekuensing.

14) Sequensing DNA

DNA hasil amplifikasi digunakan untuk tahapan peruntan DNA (Macrogen Inc. Korea Selatan). Hasil penurutan DNA selanjutnya disusun dengan program Bioedit dan dianalisis menggunakan program BLASTN dengan memanfaatkan informasi dari *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.5.3 Analisis Data

1) Contig

Dua set data urutan basa nukleotida yang didapatkan dari hasil sekuensing diolah dan digabung (contig) menggunakan perangkat lunak *CodonCode Aligner* atau *ChromasPro*. Satu set berasal dari hasil sekuensing menggunakan primer M13-F dan satu set data lainnya berasal dari hasil sekuensing menggunakan primer M13-R. Penggunaan data primer forward dan reverse untuk mengurangi peluang terjadinya kesalahan urutan basa dari mesin sequenser. Pada proses contig, didapatkan hasil berupa urutan sekuen DNA gen DBAT sebagai DNA insert.

2) Verifikasi Data Hasil Sequencing

Data hasil contig selanjutnya disejajarkan dengan data DNA di GeneBank. Pensejajaran data DNA diolah menggunakan program BLAST (*Basic Local Alligemnt Seacrh Tool*) di *National Center for Biotehnology Information* (NCBI) untuk mendapatkan bahwa sekuen DNA yang diamplifikasi merupakan gen DBAT.

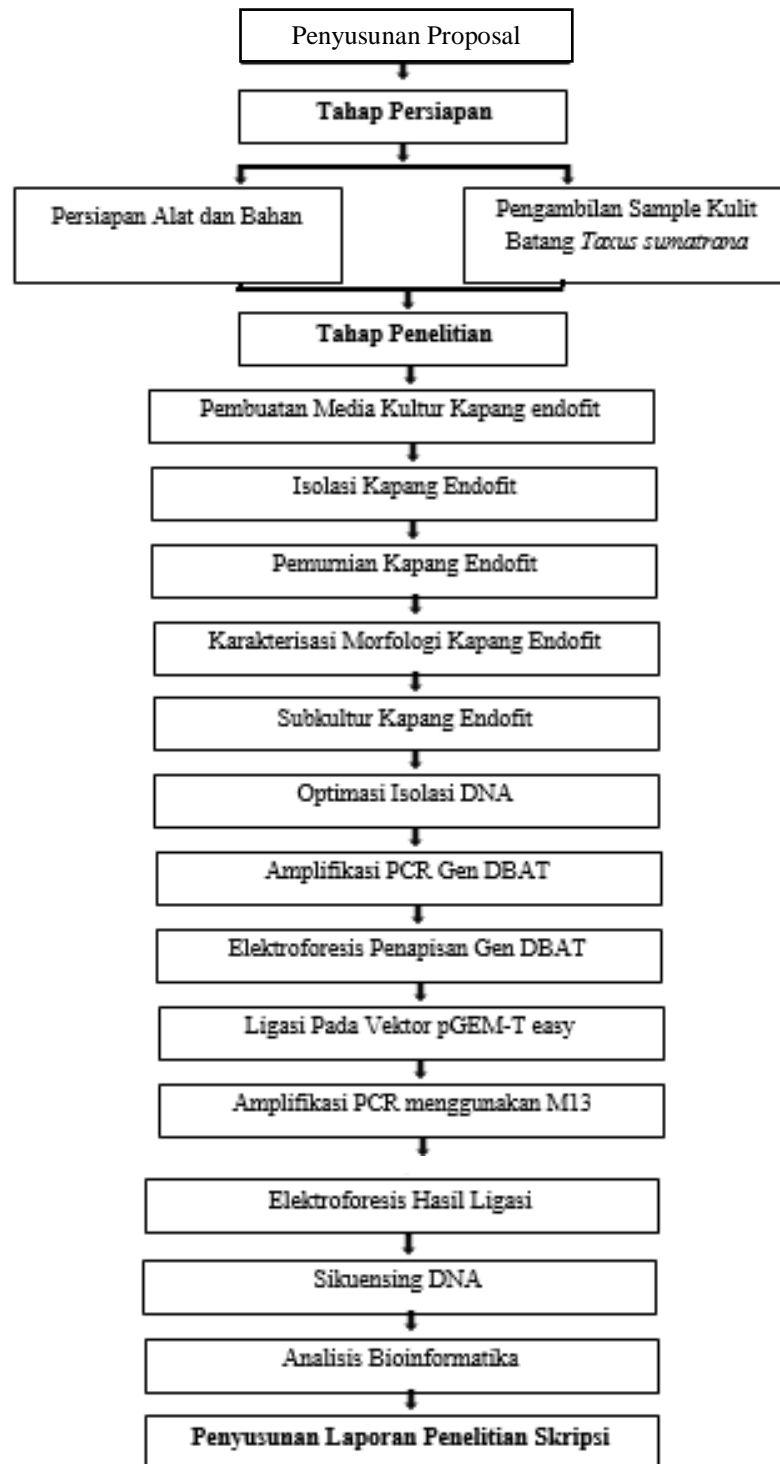
3) Editing Data

Sekuen DNA hasil contig dan sekuen DNA standar selanjutnya disejajarkan (*aligment*) menggunakan perangkat lunak ClustalX dengan format nexus (*.nxs*) dan fasta (*.fasta*). Proses ini dilakukan terhadap semua sampel hasil sekuen sebelum pembentukan pohon.

4) Analisis Pohon Filogenetik

Pembentukan pohon filogenetik dilakukan menggunakan perangkat lunak PAUP*4.0b10. Pohon dianalisis menggunakan *bootstrap* dan *Maximum parsimony* (MP) untuk mengetahui nilai kekokohan dari pohon filogenetik yang terbentuk.

3.6 Alur Penelitian



Gambar 3.3. Bagan Alur Penelitian