

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif, dikarenakan tidak ada perlakuan khusus yang diberikan pada *Aeromonas hydrophila*.

3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan mulai Bulan April hingga Juni 2022 di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa aluminium foil, autoklaf, gelas beker, gelas ukur, kit elektroforesis gel, kulkas, mesin elektroforesis, mikropipet, sentrifuge, penangas air, *Microwave*, spatula, timbangan analitik, vortex, UV Transilluminator, software *Primer Pooler*, *Primer3plus*, NCBI Primer-BLAST, serta mesin PCR thermocycler GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems TM). Untuk informasi yang lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 3.1 berikut.

Tabel 3.1.
Alat yang Digunakan

No	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
1.	<i>PCR thermocycler GeneAmp® PCR System</i>	Applied Biosystems	Melakukan proses running PCR
2.	Centrifuge	Hettich Zentrifuge EBA12	Untuk melakukan sentrifugasi pada sampel
3.	Autoclave	-	Untuk Sterilisasi Alat
4.	Water bath	-	Sebagai alat bantu untuk inkubasi sementara pada suhu tertentu

No.	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
5.	Timbangan Analitik	-	Untuk menimbang bahan
6.	Elektroforesis	Mupid-EXu	Untuk melakukan <i>running</i> elektroforesis
7.	<i>Microwave</i>	-	Memanaskan dan melarutkan Agarose dengan TBE saat membuat Gel
8.	<i>UV Transluminator</i>	BluPad	Untuk melihat hasil elektroforesis
9.	Mikropipet	DragonLab	Untuk memindahkan bahan yang diinginkan dalam volume kecil
10	Vortex	-	Mencampurkan bahan dalam tube dengan digetarkan dalam kecepatan tinggi
11	Komputer	Lenovo	Menjalankan aplikasi/ <i>software</i> perancang primer

3.3.2. Bahan Penelitian

Isolat *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas taiwanensis*, tips (putih, kuning, dan biru), kit isolasi DNA Promega, air destilasi (aquades), GoTaq® Green Master Mix, air deion, data sekuens *multiplex* PCR primer *forward* dan *reverse*, Loading dye 6x, agarosa, larutan buffer *Tris Borate EDTA* (TBE 1x), pewarna PeqGREEN, primer *forward*, primer *reverse*. Untuk Informasi yang lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2.
Bahan yang Digunakan

No	Bahan	Kegunaan
1.	Isolat <i>Aeromonas hydrophila</i> dan <i>Aeromonas taiwanensis</i>	Sebagai sampel
2.	Kit Isolasi DNA Promega	Mengisolasi DNA
3.	Tips (Putih, Kuning, dan Biru)	Untuk mengambil bahan

No	Bahan	Kegunaan
4.	Loading Dye	Pemberat dan Pewarna DNA
5.	<i>GoTaq® Green Master Mix</i>	Enzim Mix yang didalamnya sudah terkandung Buffer Primer, dNTPs, dan DNA <i>Polymerase</i>
6.	<i>Tris Borate EDTA (TBE)</i>	Buffer untuk melakukan <i>running</i> elektroforesis dan untuk membuat gel agarose
7.	Primer (Forward & Reverse)	Bahan untuk melakukan PCR yang akan menempel dengan DNA
8.	Agarose	Bubuk untuk membuat agarose yang dicampurkan dengan TBE
9.	Pewarna <i>peqGREEN</i>	Memberikan warna pada gel sehingga DNA terlihat jelas saat dilihat di dalam UV

3.4. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri atas beberapa tahap: (1) Tahap Persiapan alat dan bahan penelitian serta percobaan *in silico* untuk mendesain dan merancang primer, (2) Tahap Penelitian yang terdiri atas: (a) Persiapan sampel, (b) Isolasi dan Ekstraksi Sampel DNA, (c) Optimasi PCR, (d) Elektroforesis dan Visualisasi hasil PCR.

3.4.1. Tahap Persiapan

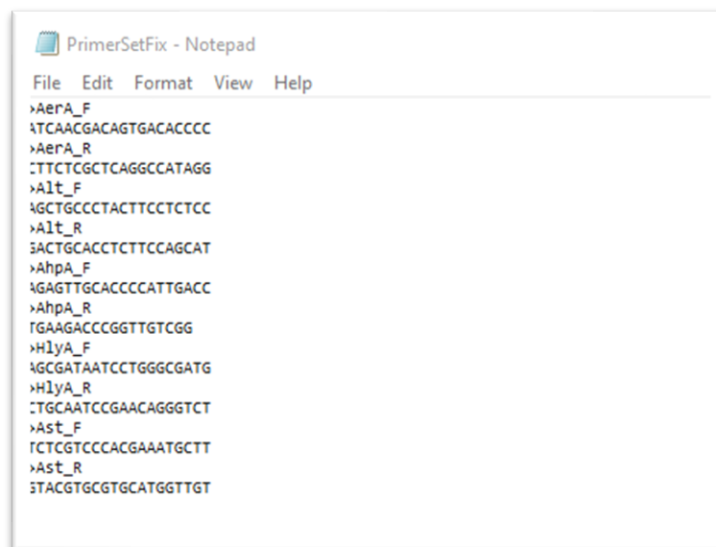
Persiapan alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian dimulai dengan melakukan pendataan alat di lab riset dan sterilisasi alat yang akan digunakan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 22 psi (1,5 atm) selama 60 menit. Selanjutnya dilakukan pemesanan isolat *strain* bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas taiwanensis* yang akan digunakan pada penelitian. Perancangan desain dari primer gen virulen secara *in silico* dapat dilakukan pada tahap persiapan ini.

1. Merancang Desain Primer *Multiplex* PCR Gen Virulen dan Pengujian secara *In-silico*

Perancangan primer dilakukan secara *in silico* di mana digunakan sekuen-sekuen DNA yang didapatkan dari laman <http://ncbi.nlm.nih.gov/>. Primer-BLAST digunakan untuk mendapatkan primer yang sesuai dengan mengikuti langkah perancangan yang dilakukan oleh Ye (2012). Sekuen DNA yang akan digunakan pada penelitian ini adalah gen virulen dari *Aeromonas hydrophila* berupa gen *AerA*, *alt*, *ahpA*, *HlyA*, dan *ast* (Lampiran 1).

Pemilihan gen primer mengacu pada penelitian yang sebelumnya dilakukan oleh Triani (2020) di mana dari hasil penelitian tersebut didapatkan beberapa primer *multiplex* yang sudah optimal untuk mendeteksi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara efektif. Primer tersebut menggunakan enam gen virulen yang terdapat pada *Aeromonas* yaitu, gen *act*, *alt*, *ast*, *aerA*, *plaa/lip*, dan *ahyB*. Adapun pada penelitian ini, digunakan hanya lima gen virulen di antaranya adalah gen *alt*, *ast*, *aerA*, *AhpA*, dan *HlyA* (Tabel 3.3) yang diambil berdasarkan literatur Kusumawaty (2016) dan Xiong (2019).

Sekuen dari gen yang akan digunakan dicari terlebih dahulu pada halaman NCBI dengan mengetik pada kolom pencarian dan mengubah filter menjadi *nucleotide* sehingga langsung menunjukkan sekuen yang ada dan tersimpan di dalam NCBI. Setelah itu, dilakukan *Pick Primer* dari Sekuen yang dipilih dalam NCBI Primer-BLAST lalu ditentukan organismenya sehingga dapat terbaca dan ditemukan beberapa primer. Primer diambil sesuai dengan ukuran produk yang diinginkan dan ditentukan sesuai dengan besaran yang diinginkan setiap primer memiliki jarak 200 bp agar dapat menampilkan hasil elektroforesis yang mudah terbaca dan tidak saling berdekatan. Jika ukuran primer yang diinginkan tidak ditemukan maka FASTA dari primer diambil (*copy&paste*) untuk dilakukan perancangan primer menggunakan program yang berbasis web *Primer3plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Sekuen dari primer yang didapat disimpan di dalam *notepad* dengan format txt (Gambar 3.1).



```

PrimerSetFix - Notepad
File Edit Format View Help
>AerA_F
ATCAACGACAGTGACACCCC
>AerA_R
TTCTCGCTCAGGCCATAGG
>Alt_F
AGCTGCCCTACTTCCTCTCC
>Alt_R
SACTGCACCTCTTCCAGCAT
>AhpA_F
AGAGTTGCACCCATTGACC
>AhpA_R
TGAAGACCCGGTTGTCGG
>HlyA_F
AGCGATAATCCTGGGCGATG
>HlyA_R
CTGCAATCCGAACAGGGTCT
>Ast_F
TCTCGTCCCACGAAATGCTT
>Ast_R
STACGTGCGTGCATGGTTGT

```

Gambar 3. 1. Sekuen Primer yang Disimpan

Hasil primer yang sudah didesain dan disimpan dilakukan pengujian secara *in silico* menggunakan *software Primer Pooler* yang menggunakan protokol standar primer pooler untuk mengetahui apakah primer yang digunakan muncul *dimer* dan *overlaps*. Kedua hal tersebut dapat menimbulkan masalah pada saat *multiplex* PCR dijalankan, seperti muncul pita DNA yang tidak spesifik pada hasil amplifikasi. Primer yang sudah dibuat dalam bentuk txt (Gambar 3.1) kemudian dibuka dalam *Primer Pooler*. Kemudian dilanjutkan dengan mengisi ukuran delta G yang nantinya akan ditunjukkan hasil yang menunjukkan besaran delta G pada primer yang digunakan. Syarat primer yang baik adalah Delta G tidak lebih dari -7 kkal/mol karena semakin negatif maka kemungkinan *dimer* dan *overlaps* semakin besar (Brown *et al.*, 2017).

Pooler akan menanyakan kembali apakah *threshold* akan dilihat atau tidak. Setelah ditunjukkan hasil *threshold* maka dibutuhkan FASTA dari genome yang akan digunakan sebagai referensi. Pada penelitian ini untuk mengetahui apakah primer yang dirancang menempel atau tidak dengan sampel DNA yang digunakan maka digunakan genome assembly *Aeromonas hydrophila* yang ada pada NCBI sebagai kontrol. *Pooler* akan menjalankan simulasi PCR dan melihat apakah primer yang digunakan menempel pada DNA referensi dan apakah terdapat *overlaps* pada primer yang dirancang.

Tabel 3.3.
Data Gen yang Digunakan untuk Merancang dan Mendesain Primer

No.	Gene Bank	Nama Sekuen
1.	AF485772.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AHK4 aerolysin (<i>aerA</i>) gene, partial cds
2.	L77573.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> cytotoxic enterotoxin (<i>alt</i>) gene, complete cds
3.	KU845727.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B48 AhpA gene, partial cds
4.	KC812121.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain FZMH2 hemolysin (<i>hlyA</i>) gene, partial cds
5.	AF419157.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate SSU enterotoxin (<i>ast</i>) gene, complete cds

Pengujian homologi BLAST juga dilakukan untuk mengetahui apakah primer yang dirancang tepat ditujukan untuk *Aeromonas hydrophila* atau tidak. Pengujian dilakukan dengan menyalin FASTA primer ke laman web NCBI-BLAST di mana nanti akan diperlihatkan hasil berupa tabel yang menunjukkan persentase kesesuaian primer dengan DNA yang ada pada GeneBank NCBI.

3.4.2. Tahap Penelitian

1. Isolasi Strain Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas taiwanensis*

Isolat *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas taiwanensis* didapatkan dari Indonesian Culture Collection (InaCC) Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Bogor, sedangkan untuk *A. hydrophila* didapatkan dari Sekolah Ilmu Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (SITH ITB). Setelah didapatkan, maka semua strain bakteri di subkultur dalam laminar air flow. Strain *A. hydrophila* dan *Aeromonas taiwanensis* dikultur dalam medium NA miring lalu diinkubasi di suhu 37°C selama 18 jam. Bakteri yang sudah diinkubasi disimpan di dalam plastik dan dilabeli lalu dimasukkan ke dalam kulkas untuk disimpan. Untuk penyimpanan jangka panjang, maka bakteri dimasukkan dalam cryo buffer. Di mana tabung 1,5 ml yang berisikan 600 µL cryo buffer diinokulasi satu loop penuh berisi isolat bakteri untuk disimpan pada freezer di suhu -20°C.

2. Ekstraksi Sampel DNA Bakteri *A. hydrophila* dan *A. taiwanensis*.

Template DNA A. hydrophila dan *Aeromonas taiwanensis* didapatkan menggunakan metode yang terdapat pada manual kit ekstraksi DNA Promega menggunakan pemanasan sederhana dengan cara dipanaskan menggunakan air mendidih seperti yang dilakukan oleh (Hossain *et al.*, 2013). Sebanyak 1 ml PBS (*Phospat Buffer Saline*) dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml steril, kemudian kultur bakteri sebanyak satu ose dimasukkan dan dihomogenkan dengan alat vortex. Masukkan tabung ke dalam alat sentrifugasi dan set pada kecepatan 13,000-16,000 x g selama 2 menit untuk mendapatkan pellet, lalu buang *supernatant* yang ada pada tabung dan tambahkan 600 μ L *Nucleic Lysis Solution* secara perlahan dalam tabung dengan menggunakan mikropipet. Inkubasi pada waterbath 80°C selama 5 menit untuk melisiskan sel setelah itu simpan untuk didinginkan pada suhu ruang. Tambahkan 3 μ L RNase Solution ke dalam tabung lalu campurkan secara perlahan dengan membolak balik tabung sebanyak dua hingga lima kali. Inkubasi kembali dalam suhu 37°C selama 15-60 menit dan dinginkan dalam suhu ruang. Tambahkan kembali 200 μ L *Protein Precipitation Solution* ke dalam tabung yang ditambah Rnase tadi lalu vortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik. Inkubasi sampel dalam es selama 5 menit dan masukan ke dalam mesin sentrifugasi untuk *dirunning* selama 3 menit dalam kecepatan 13,000-16,000. Pindahkan supernatan yang mengandung DNA ke dalam tabung 1.5ml yang baru dan sudah terisi 600 μ L isopropanol (sisakan sedikit supernatan di dalam tabung lama untuk menghindari kontaminasi protein). Campurkan dengan membolak balik tabung hingga benang DNA terlihat. Masukan kembali ke dalam mesin sentrifugasi dengan kecepatan 13,000-16,000 selama 2 menit dan perlahan buang supernatan dengan menuangkan secara perlahan ke tisu lalu tambahkan 600 μ L 70% etanol dan campurkan perlahan untuk membersihkan pellet DNA. Kembali masukan ke dalam sentrifugasi dengan waktu dan kecepatan yang sama lalu buang ethanol secara perlahan. Buang dan anginkan tube yang digunakan selama 10-15 menit. Tambahkan 100-200 μ L *DNA Rehydration Solution* lalu inkubasi dalam 65°C selama satu jam, atau dapat dibiarkan dalam suhu ruang atau suhu 4°C semalam. Untuk penyimpanan simpan DNA pada suhu 2-8°C (Promega Corporation, 2019).

3. Pengujian Kuantitatif dan Kualitatif DNA (16S rDNA)

Setelah DNA diisolasi, maka DNA diuji kuantitasnya dengan menggunakan spektrofotometri dan kualitasnya dengan menggunakan primer 16S yang dipakai pada penelitian Kusumawaty (2016). Pengujian kuantitatif dilakukan dengan mencampurkan 5 µl DNA dengan 450 µl deion yang kemudian dimasukkan ke dalam kuvet khusus untuk DNA dan dihitung dengan menggunakan spektrofotometri. Untuk menghitung nilai kemurnian, digunakan perhitungan $\frac{A_{260}}{A_{280}}$, sedangkan untuk konsentrasi DNA digunakan rumus perhitungan $A_{260} \times 50 \times$ faktor pengenceran.

Pengujian kualitatif DNA dilakukan dengan membuat mix PCR dengan total volume 10 µL untuk kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan suhu *Annealing* 54°C (Kusumawaty *et al.*, 2016). Hasil dari PCR tersebut divisualisasikan dengan cara *running* elektroforesis dan melihat hasilnya pada UV. Selain untuk mengetahui kualitas dari DNA, pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah DNA yang digunakan merupakan DNA bakteri atau bukan. Pengujian kualitatif dapat langsung dilakukan tanpa menggunakan primer 16S, dengan cara mencampurkan 5 µL DNA dengan 1 µL loading dye. Namun pengujian secara langsung memiliki dipengaruhi oleh konsentrasi DNA. Pengujian dengan menggunakan primer biasanya dilakukan juga pada DNA yang berkonsentrasi rendah, karena pada saat pengujian ini DNA diamplifikasi / diperbanyak melalui proses PCR yang menyebabkan hasil DNA dapat terlihat pada gel elektroforesis.

4. Optimasi Protokol *Single*-PCR

Optimasi PCR dilakukan untuk mengecek spesifisitas dari lima gen primer yang sudah dirancang. Pengujian dilakukan dengan memasukan masing masing gen primer pada tiap sampel *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas taiwanensis* menggunakan *single* PCR (Xiong *et al.*, 2019). Seluruh sampel *Aeromonas* diujikan dengan menggunakan primer *A. hydrophila* yang sudah dipesan dan dilarutkan sebelumnya. Primer kemudian diencerkan agar konsentrasinya tidak berlebihan lalu dicampur kedalam tabung PCR untuk dibuat mix dengan volume 10µL bersamaan dengan DNA, Enzim Mix, dan juga Deion. Hasil isolat DNA tiap sampel diamplifikasi dengan menggunakan mesin PCR dengan suhu *Annealing* yang berbeda dan bertahap (55°-65°C) dan divisualisasikan dengan

menggunakan gel dan mesin elektroforesis serta dilihat dalam sinar UV. Optimasi ini bertujuan untuk mengetahui apakah primer yang dibuat berhasil diamplifikasi atau tidak, serta untuk mencari suhu *Annealing* yang optimal untuk primer yang dirancang.

5. Optimasi *Multiplex* PCR

Setelah dilakukan optimasi pada masing-masing gen primer maka dilakukan kembali optimasi satu tabung pada *multiplex* PCR di mana satu tabung tersebut dimasukan lima gen primer dengan DNA yang berbeda-beda. Primer kemudian dimasukan ke dalam tube PCR Tube dengan volume reaksi total adalah 25 μ L terdiri atas 12,5 μ L GoTaq® Green Master Mix 2X, 2 μ L DNA *template*, 5 μ L campuran primer, dan 5,5 μ L deion, dilakukan replikasi DNA menggunakan mesin PCR (Xiong *et al.*, 2019). Parameter dari PCR dilakukan sebagai berikut: inisiasi denaturasi selama 3 menit di suhu 95°C, diikuti dengan 30 kali pengulangan selama 30 detik pada suhu 95°C untuk denaturasi, *Annealing* selama 30 detik dalam lima temperatur *Annealing* yang berbeda dari 55°C hingga 65°C, ditambah dengan 30 detik *extension* awal pada suhu 72°C, dan tahap terakhir untuk *extension* selama 5 menit di suhu 72°C dalam mesin PCR.

6. Elektroforesis dan Visualisasi dari Hasil PCR

Produk PCR divisualisasikan dalam gel agarose 1% melalui teknik elektroforesis. Gel terbuat dari 0,3gram agarosa dalam 30 ml larutan buffer panas (1 x TBE). Larutan agarosa dipanaskan dengan menggunakan penangas selama 2 menit atau dengan microwave selama 45 detik hingga larutan terlihat bening dan sudah tercampur secara menyeluruh. Larutan kemudian dibiarkan agak dingin, yang kemudian ditambahkan pewarna peqGREEN 4 μ L. Larutan dimasukan ke dalam cetakan khusus untuk agarose gel yang sudah disiapkan dengan ukuran gel dan sisir untuk membuat sumur. Biarkan Gel hingga mengeras dan memutih lalu pindahkan gel beserta cetaknya ke dalam mesin elektroforesis yang sebelumnya ditambahkan larutan *buffer* untuk *running* elektroforesis yang sama dan sesuai dengan larutan *buffer* untuk membuat gel elektroforesis (TBE atau TAE). Gel yang dimasukan harus terendam seluruhnya. DNA dimasukan ke dalam masing-masing sumur sebanyak 3 μ L. Lalu pilih voltase dan lama waktu elektroforesis dan tekan tombol untuk *start*. Elektroforesis dilakukan selama 30

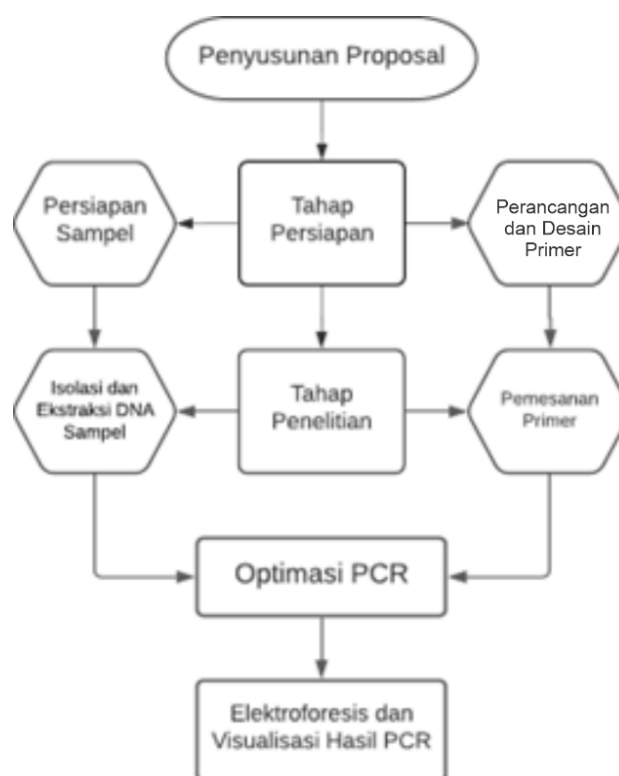
menit pada tegangan konstan 100 volt atau hingga pewarna mencapai dasar gel. Setelah selesai gel diambil dari mesin elektroforesis untuk dilihat dibawah sinar UV dan didokumentasikan (Indriati & Yuniarsih, 2019).

7. Analisa Hasil Protokol *Single* dan *Multiplex* PCR

Visualisasi hasil PCR untuk dilihat apakah DNA yang digunakan berhasil teramplifikasi atau tidak, melihat gen apa saja yang muncul, serta dibandingkan dengan hasil PCR yang sudah dilakukan oleh Triani (2020) untuk dilihat kelebihan dan apa saja masalah yang diselesaikan oleh penelitian ini.

3.5. Alur Penelitian

Secara garis besar, penelitian ini terbagi menjadi dua tahap, tahap persiapan yang terdiri dari persiapan alat dan perancangan primer dan tahap penelitian yang terdiri dari pengujian kualitatif DNA, pengujian secara *single* PCR, Pengujian *multiplex* PCR, dan analisis data hasil PCR. Dari beberapa tahapan di atas, maka dapat dibuatkan bagan alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2 di bawah ini.



Gambar 3. 2. Bagan Alur Penelitian
(Ricky, 2022)