

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian telah berlangsung sejak bulan Januari 2012 - Juli 2012 di Laboratorium Mikrobiologi, Lab. Optik, Lab. Genetika dan Lab. Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Cawan petri, LAF (*Laminar Air Flow*), Rotary-shaker, Tabung reaksi 10 ml, Rak Tabung, Botol semprot, Botol kaca 50 ml, Beaker glass 1 liter, 50 ml, 100 ml, 500 ml, Pengaduk kaca, Pinset, Blade, Labu ukur, Freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ , Freezer  $5^{\circ}\text{C}$ , Freezer  $20^{\circ}\text{C}$ , Erlenmeyer, Kompor listrik, Stirrer, Pipet tetes, Sarung tangan, Masker, Autoklaf, Mikropipet, Neraca analitik, Vortex, Mikrosentrifus, Tube, Inkubator, PCR, Trans UV Illuminator (BioRad) dan Elektroforesis horizontal (BioRad).

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman kentang (*S. tuberosum*) varietas Granola yang diperoleh dari perkebunan daerah sumber brantas, Kota Batu, Jawa Timur. Sampel berupa akar. Media penumbuhan Isolat

bakteri yaitu YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Agar*) dan media penumbuhan kultur bakteri yaitu LB (*Luria Bertani*). Larutan pelisis, larutan RNase, 10 % Gliserol, Larutan STE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, H<sub>2</sub>O sampai 200 ml), Lisozim (50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA, 5 mM Lisozim, H<sub>2</sub>O sampai 100 ml), Buffer Lisis (2% SDS, 200 mM EDTA, H<sub>2</sub>O sampai 1 ml), Larutan CI (Chloroform: Isoamilalkohol, 24:1), Na Asetat, Etanol 70%, Etanol absolute, TE (Tris EDTA), Gel agarose 1 %, larutan 1x TBE, Marker 100 bp, Loading dye, Ethidium Bromida, Master Mix, Primer 27F dan 1492r dan Primer umum gen 16S rDNA.

### **3.3 Cara Kerja**

#### **3.3.1 Isolasi Bakteri Endofit**

Akar *Solanum tuberosum* L. varietas Granola diperoleh dari perkebunan kentang daerah sumber brantas, Kota Batu, Jawa Timur. Tahapan isolasi bakteri endofit *Solanum tuberosum* L. Sampel dicuci dengan air mengalir agar bersih dari tanah kemudian sampel dipotong kecil-kecil sekitar 3 cm dengan menggunakan blade steril. Akar *Solanum tuberosum* L. dicuci dalam 70% ethanol dan 3% *sodium hypochlorit* selama 3 menit, dibilas 2 kali di aquades steril. Isolat ditanam di media YPDA (*Yeast extract* 3 g, *peptone* 0.6 g, *dextrose* 3 g, agar 15 g, aquades 1 liter, pH 7.2). Morfologi koloni dilihat dari isolasi bakteri pada 24, 48, dan 96 jam dengan karakter ukuran, warna, bentuk, dan angka pertumbuhan (Long, 2003).

### 3.3.2 Pewarnaan Gram

Tahapan pewarnaan Gram dilakukan dengan cara mengambil sedikit isolat bakteri secara aseptik dengan menggunakan ose. Sampel dicampurkan pada 2 tetes akuades steril di atas kaca preparat, lalu mengeringkan dengan menggunakan api bunsen. Pewarnaan dilakukan dengan cara meneteskan larutan Kristal violet selama 1 menit, dibilas lalu diteteskan larutan lugol selama 3 menit. Larutan safranin diteteskan dan dibiarkan menyerap selama 1 menit, dibilas dan dikeringkan dengan menggunakan api bunsen. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 1.000x. Jika bakteri berwarna merah keunguan menandakan termasuk golongan Gram positif dan berwarna merah muda termasuk golongan Gram negatif.

### 3.3.3 Kultur Bakteri

Isolat bakteri endofit dipilih yang telah diperbanyak secara terpisah pada masing-masing 50 ml Luria Bertani (LB) dalam tabung reaksi. Isolat bakteri endofit diinkubasi menggunakan rotary shaker pada 150 rpm selama 24 jam.

### 3.3.3 Isolasi DNA Genom dari Bakteri Endofit

Metode isolasi DNA menggunakan Promega Kit, tahap utama yaitu

1. Kultur bakteri sebanyak 1 ml dimasukkan dalam 1,5 ml tabung mikrosentrifus.
2. Proses sentrifugasi dilakukan selama 2 menit pada 13.000-16.000 rpm dan dibuang supernatan.
3. Resuspensi sel dalam 50 mM EDTA 480µl.

4. Tahap selanjutnya untuk Gram positif ditambahkan lytic enzyme yang sesuai ke pellet resuspensi sel dengan volume total 120  $\mu$ l dan pipetting. Tujuannya untuk memecah dinding sel. (Spesies *Staphylococcus*, diperlukan campuran 10mg/ml lysozyme 60  $\mu$ l dan 10mg/ml lysostaphin 60  $\mu$ l untuk melisiskan secara efisien).
5. Larutan sampel diinkubasi pada 37°C 30-60 menit, lalu disentrifugasi selama 2 menit pada 13.000-16.000 rpm dan dibuang supernatant,
6. Tahap lisis sel ini hanya dilakukan jika sampel bakteri Gram negatif. Tahap lisis sel dilakukan dengan ditambahkan 600  $\mu$ l Nuclei Lysis Solution kemudian dipipeting untuk mencampurkan.
7. Larutan sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 80°C untuk melisiskan sel, selanjutnya dinginkan pada suhu ruang.
8. Larutan sampel ditambahkan 3  $\mu$ l RNase Solution hingga sel lisis.
9. Larutan sampel diMix dengan membalikkan tube 2-3 kali agar tercampur rata, lalu di inkubasi pada suhu 37°C selama 15-60 menit untuk proses penghancuran RNA, didinginkan hingga mencapai suhu ruang.
10. Tahap presipitasi yaitu larutan sampel ditambahkan 200  $\mu$ l Protein Precipitation Solution ke RNase. Lalu divortex dengan kecepatan tinggi selama 20 detik untuk mencampurkan Protein *Precipitation Solution* dengan sel lisis.
11. Sampel diinkubasi pada es selama 5 menit.
12. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 3 menit.
13. sampel dipindahkan supernatant yang berisi DNA ke 1,5 ml tabung mikrosentrifus yang berisi 600  $\mu$ l isopropanol suhu ruang. Secara hati-hati

dibolak balik tube hingga muncul benang seperti kumpulan bentukan untai DNA.

14. sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 2 menit. Secara hati-hati diambil ethanol.
15. sampel dikeringkan tube dengan kertas penghisap dan kering anginkan 10-15 menit.
16. sampel ditambahkan 100  $\mu$ l DNA Rehydration Solution (10 mM Tris HCl-pH 7,4 dan 1mM EDTA-pH 8) ke dalam tube dan rehidrasi DNA dengan di inkubasi pada suhu 65<sup>0</sup>C selama 1 jam. Alternatif lain: di inkubasi solution semalam pada temperatur ruang atau pada suhu 4<sup>0</sup>C.
17. sampel disimpan DNA pada 2-8<sup>0</sup>C (Promega).

Metode isolasi DNA konvensional yaitu

1. Tahap pemanenan Sel, 1,5 ml kultur bakteri dari media Luria Bertani dituang ke dalam tube 1,5 ml, lalu disentrifugasi 12.000 rpm 5 menit, dibuang supernatant. Proses ini diulangi hingga 5 ml kultur bakteri.
2. Selanjutnya sampel diberi 10 % gliserol 100  $\mu$ l, kemudian disimpan pada suhu 5<sup>0</sup>C. Tahap ini bertujuan agar mendapatkan pellet sel yang terpisah dari media pertumbuhannya.
3. Tahap pelepasan DNA dari sel, gliserol 10 % dipindahkan 20  $\mu$ l bakteri dalam tube 1,5 ml baru.
4. sampel ditambahkan STE 1 ml, di vortex sampai homogen lalu disentrifugasi 5000 rpm 5 menit, dibuang supernatan lalu di keringkan.

5. sampel ditambah lisozim 200  $\mu$ l, divortex sampai larut agar enzim bekerja merata dan efektif.
6. sampel di Inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 1 jam. Ditambahkan Buffer lisis 200  $\mu$ l (*fresh*) dingin, bolak balik sampai larut kurang lebih 1 menit.
7. sampel ditambahkan CI dingin (Chloroform:Isoamilalkohol, 24:1) sebanyak 1x volume supernatan pada subtahap sebelumnya.
8. sampel ditambahkan Fenol dingin 100  $\mu$ l, lalu bolak balik sampai larut. Selanjutnya sampel disentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit.
9. sampel dipindahkan DNA pada larutan bagian paling atas, jangan sampai protein yang berada pada bagian larutan kedua ikut tersedot. Diketahui volume DNAny.
10. Tahap ketiga, sampel ditambahkan CI dingin sebanyak 1x volume supernatant pada tahap sebelumnya. Disentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit.
11. Sampel dipindahkan DNA ke tube baru dengan menyedot larutan bagian paling atas, jangan sampai protein ikut tersedot.
12. Sampel ditambahkan Na Asetat 3M pH 5,2 (1/10 Volume supernatan) dan ditambahkan etanol absolut (2x Volume supernatan).
13. Sampel diinkubasi 2 jam -20<sup>0</sup>C.
14. Sampel disentrifugasi 13.000 rpm 10 menit, buang supernatan.
15. Sampel dikeringkan sisa etanol menggunakan hairdryer, biarkan etanol menguap.
16. Sampel ditambahkan 50  $\mu$ l TE (Tris EDTA). Vorteks perlahan, DNA terlarut dalam 50  $\mu$ l TE. Sampel disimpan DNA pada suhu 5<sup>0</sup>C.

### 3.3.4 Amplifikasi menggunakan PCR

Amplifikasi gen 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan Primer spesifik untuk prokariot. Hasil isolasi DNA Genom dari isolat bakteri endofit diamplifikasi menggunakan teknik PCR dengan Primer universal/ umum dan Primer khusus/ spesifik yaitu:

**Tabel 3.1** Urutan Primer yang digunakan dalam uji PCR-RAPD gen 16S rDNA

Primer	Urutan nukleotida (5'-3')
Universal	
16S rDNA-1-	(5'-GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA-3')
16S rDNA-2	(5'-CGTGCTGGCAACAAAGGACAG -3')
	(Dorsch <i>et al.</i> , 1994).
Spesifik	
27F	(5' AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3')
1492R	(5' TAC GGC TAC CTT GTT ACG A 3')
	(Elavazhagan, 2009).

Komposisi reaksi PCR terdiri dari ddH<sub>2</sub>O 5 µl, Taq DNA polymerase 5 µl, Master Mix 6 µl, Primer 27F 2 µl, Primer 1492R 2 µl, dan DNA genom 5 µl. Begitu pula dengan komposisi untuk reaksi PCR dalam penggunaan Primer umum 16S rDNA terdiri dari ddH<sub>2</sub>O 5 µl, Taq DNA polymerase 5 µl, Master Mix 6 µl, Primer 16S rDNA *forward* 2 µl, Primer 16S rDNA *reverse* 2 µl, dan DNA genom 5 µl.

Amplifikasi gen 16S rDNA dilakukan dengan *Pre*denaturasi (94<sup>0</sup>C selama 3 menit), denaturasi (94<sup>0</sup>C selama 1 menit), annealing (50<sup>0</sup>C selama 1 menit), dan Elongasi (72<sup>0</sup>C selama 2 menit) sebanyak 27 siklus (Polz and Cavanaugh,1998).

### 3.3.5 Elektroforesis Gel Agarosa

Kemurnian DNA sampel diuji melalui elektroforesis gel. Sampel dan sebuah marker DNA ladder 100 kb di elektroforesis untuk konfirmasi kemurnian

DNA. Pembuatan gel agarosa 1% dalam larutan buffer TBE 1x. Marker yang digunakan adalah 100 kb DNA *ladder* (Vivantis). Perangkat elektroforesis (Bio-Rad) disiapkan sesuai prosedur standar. Pemisahan DNA produk PCR juga dilakukan pada mesin Elektroforesis padategangan listrik 70 Volt selama 45 menit. Kemudian visualisasi DNA dilakukan di atas UV transluminator menggunakan pewarna Ethidium Bromida (EtBr).

