

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2012 sampai bulan Juli 2012, yang bertempat di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Instrumen Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, LAF (*Laminar Air Flow*), tabung reaksi, *beacer glass*, pengaduk kaca, pinset, blade, mikropipet, vortex, labu erlenmeyer, kompor listrik, pipet tetes, autoklaf, mikroskop computer, objek glass, deck glass, mikrosentrifus, rotary-shaker, tube, spektrofotometer, PCR, dan elektroforesis horizontal.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) varietas Granola yang diperoleh dari perkebunan daerah sumber brantas, Kota Batu, Jawa Timur. Sampel berupa akar, umbi dan batang. Media penumbuhan bakteri yang digunakan YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Agar*), LB (*Luaria Bertani*) dan cat gram. Larutan pelisis, larutan RNase, Larutan PP, Etanol 70%, Primer, gel agarose 1,5 %, larutan TBE, dan EtBr.

3.3 Kegiatan Penelitian

3.3.1 Sterilisasi Alat-Alat

Terlebih dahulu alat dan bahan yang digunakan harus disterilkan, untuk alat-alat gelas dan cawan petri setelah dicuci dikeringkan. Selanjutnya dibungkus dengan kertas atau ditutup dengan kapas (untuk tabung) dan dimasukkan dalam plastik tahan panas. Suhu yang digunakan pada saat sterilisasi adalah suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 20 menit.

3.3.2 Isolasi Bakteri Endofit

S. tuberosum diperoleh dari perkebunan kentang sekitar Kota Batu, Malang Jawa Timur. Sampel berupa umbi kentang, untuk mengisolasi bakteri endofit dari bagian umbi tanaman kentang. Pertama mencuci umbi tanaman kentang dengan air mengalir dan membilasnya dengan akuades steril. Kemudian dipotong-potong kecil berukuran sekitar 1cm, dan keringkan dengan tissue. Potongan tersebut digunakan untuk isolasi bakteri endofit. Dalam isolasi bakteri endofit ini digunakan medium YPDA (*Yest Potato Dextrose Agar*).

3.3.3 Pembuatan Media YPDA (*Yest Potato Dextrose Agar*)

Dalam pembuatan media YPDA, yang dilakukan pertama kali adalah YPDA ditimbang dengan takaran (*Yest* = 0,3g. *Potato* = 0,06g. *Dextrose* = 0,3g. *Agar* = 1,5g). Kemudian, ditambahkan akuades sebanyak 100ml pada YPDA. Setelah itu YPDA yang telah ditambahkan dengan akuades dipanaskan hingga mendidih. Jika sudah mendidih, media YPDA tersebut diangkat dan dituang ke dalam tabung reaksi (15 buah) dan cawan petri (5 buah), dengan takaran 10 ml

tiap tabung atau cawan. Langkah terakhir menutupnya kembali atau menggunakan kapas untuk tabung reaksi.

3.3.4 Kultur Bakteri Endofit

Isolat bakteri endofit yang telah dipilih (dari 6 kultur, masing-masing satu isolat) diperbanyak secara terpisah pada masing-masing 10 ml media YPDA miring pada tiap-tiap tabung reaksi. Selain itu dilakukan pemindahan bakteri endofit pada media LB (*Luria Bertani*) dengan 10 ml pada tiap-tiap tabung reaksi.

3.3.5 Isolasi DNA Genom dari Isolat Bakteri Endofit Secara Konvensional

ekstraksi DNA yang dilakukan menggunakan teknik dari (Sambork 2001). Dengan melewati 2 tahap yaitu isolasi DNA dan preparasi DNA. Berikut adalah tahapan ekstraksi DNA bakteri endofit;

a. Pemisahan Pelet dengan Media kultur

Isolat bakteri yang telah murni, masing-masing ditumbuhkan dalam media LB (*Luria Bertani*) cair. Bakteri ditumbuhkan selama 18-24 jam pada suhu 28°C dalam rotary shaker dengan kecepatan 150-200 rpm. Kemudian bakteri dipanen sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam eppendorf, disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit dan supernatannya dibuang. Pelet yang telah mengendap dalam eppendorf, dikeringkan dan kemudian dicuci dengan gliserol 20% sebanyak 100µl.

b. Isolasi DNA Tahap 1

1. Pelet diambil sebanyak 40 μ l, dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Kemudian ditambahkan 1ml STE kedalam tabung eppendorf yang berisi pelet.
2. Tabung eppendorf yang berisi pelet divorteks agar homogen, dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Jika sudah, supernatan dibuang dan tabung eppendorf dikeringkan dengan tissue. Agar sisa STE tidak mengganggu saat isolasi berlangsung.
3. Pelet yang berada dalam tabung eppendorf, kemudian ditambahkan 200 μ l lysozym (50 mg/ μ l) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam (setiap 15 menit dibolak-balik).
4. Setelah itu, pelet tersebut ditambahkan 200 μ l buffer lisis, dibolak-balik sampai larut (\pm 1 menit), dan hati-hati jangan sampai tutup kurang rapat.
5. Jika sudah, tambahkan Klorofom Isoamil sebanyak 1x volume supernatant. Ditambahkan pula 100 μ l fenol, bolak-balik hingga larut. Kemudian sentrifus selama 10 menit dengan 13.000rpm, hingga tampak DNA, protein dan RNA yang memisah.
6. Pindahkan DNA yang ada pada permukaan dengan menggunakan tip tumpul pada eppendorf yang baru.

c. Preparasi DNA Tahap 2

1. Supernatant yang dipindah pada ependorf baru, ditambahkan Clorofom Isoamil untuk mengetahui protein ikut atau tidak. Choloroform isolamil tersebut sebanyak 1x volume supernatan. Kemudian disentrifugasi 13.000rpm selama 10 menit.
2. Pindahkan kembali DNA yang ada dipemukaan kedalam tabung eppendorf baru jika protein masih ikut.
3. Tambahkan Na Asetat 3M pH 5,2 sebanyak 1/10 volume supernatant, dan tambahkan juga ethanol absolute sebanyak 2x volume supernatant pada ependorf berisi supernatant tersebut.
4. Kemudian diinkubasi pada suhu dingin atau 4°C selama 2 jam. Setelah diinkubasi sampel tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Jika sudah, buang supernatant dan sisakan pelet pada tabung eppendorf.
5. DNA dalam bentuk pelet dicuci dengan 500µl ethanol 70% dingin, disentrifugasi perlahan 1000rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dan dikeringkan selama 10-15 menit untuk menguapkan ethanol yang masih tersisa.
6. Langkah terakhir dalam ekstraksi DNA adalah penambahan Tris EDTA 50µl dan selanjutnya DNA disimpan pada suhu -20°C untuk keperluan selanjutnya.

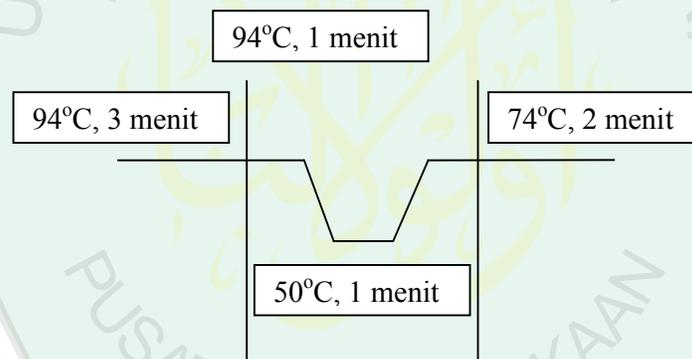
3.3.6 Amplifikasi Menggunakan PCR

Amplifikasi gen 16S rDNA dilakukan dengan melalui reaksi berantai *polymerase* (PCR). Isolasi DNA genom dari isolat bakteri endofit diamplifikasikan menggunakan teknik PCR dengan primer 27F dan 1492R;

27F – (5' AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG 3') – FORWARD

1492R – (5' TAC GG(CT) TAC CTT GTT ACG A 3') – REVERSE

PCR berjalan selama \pm 27 siklus dengan suhu awal 94°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan selama 1 menit. diturunkan suhu 50°C selama 1 menit dan suhu terakhir adalah 72°C selama 2 menit.

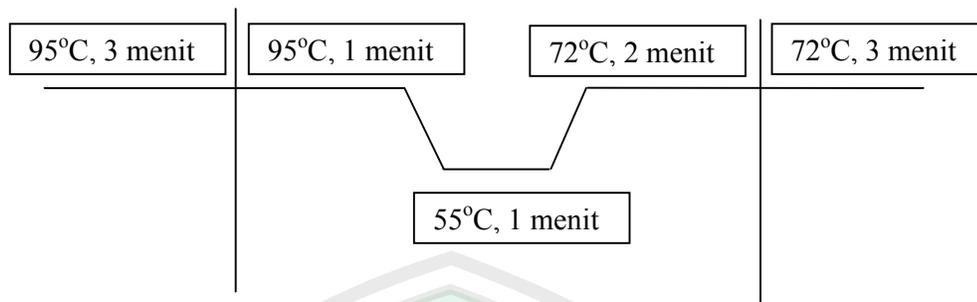


Primer yang digunakan pertama merupakan primer yang khusus digunakan untuk bakteri, diambil dari gen 16S rDNA. Sedangkan primer yang kedua ini, merupakan primer yang umumnya digunakan pada semua jenis bakteri.

785F - (5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC-3') - Forward

802R - (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') - Revers

Maka digunakan primer umum dari gen 16S rDNA ini untuk perbandingan pada primer pertama. Dengan ketentuan siklus pada PCR sebagai berikut;



PCR berjalan selama ± 40 siklus dengan suhu awal 95°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan selama 1 menit, diturunkan suhu 55°C selama 1 menit, dinaikkan kembali pada suhu 72°C selama 2 menit, dan suhu terakhir adalah 72°C selama 3 menit.

3.3.7 Elektforesis Gel Agarosa

Kemurnian DNA sampel diuji melalui elektforesis gel. Sampel dan sebuah marker DNA ladder 500kb dielektforesis untuk konfirmasi kemurnian DNA. Pembuatan gel agarosa 1,5% dalam larutan buffer TBE 1x yang mengandung etidium bromide (0,5 $\mu\text{g/ml}$) dan perangkat elektforesis (Bio-Rad) disiapkan sesuai prosedur standar.

3.3.8 Analisis Data

Analisa dilakukan secara deskriptif terhadap pita-pita DNA pada hasil gel elektforesis hasil Genom, dan PCR. Hasil pemotretan profil DNA (pola pita DNA) dengan teknik RAPD selanjutnya diterjemahkan kedalam data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita dengan ketentuan nilai 1 (satu) apabila ada

pita dan nilai 2 (dua) apabila tidak ada pita pada satu posisi yang sama dari setiap individu yang dibandingkan. Hasil dari data selanjutnya dilakukan penentuan pola pita RAPD sebagai pita yang dikategorikan fragmen yang dihasilkan tidak muncul pada beberapa sampel. Apabila semua pita muncul pada semua populasi dikategorikan sebagai spesifik marker.

