

BAB IV

Metode Penelitian

4.1. Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode survey, dimana bakteri potensial probiotik diambil dari saluran pencernaan (usus dan lambung) ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dari loka Budidaya laut Batam. untuk mengetahui diversikasi probiotik pada ikan kerapu diambil sebanyak 10 ekor ikan, yang berukuran 500 gram. Bahan yang digunakan selama penelitian antara lain : Larutan pengencer (NaCl 0,9 %), media agar TSA (*Tryptic Soya Agar*), medium pH asam, aquadest dan alkohol.

Pada lambung usus ikan dalam kondisi sehat di temukan sejumlah bakteri yang mampu untuk mencernakan makanan yang tidak mampu dicerna oleh usus. Sebahagian besar dari bakteri tersebut memiliki pengaruh positif terhadap ikan. Tetapi jumlahnya relatif kecil sehingga dampak positif yang diberikan relatif kecil. Kondisi ini dapat dikembangkan dan dapat mempercepat pertumbuhan ikan budidaya. Sebahagian bakteri tersebut memproduksi anti mikroba yang dapat merusak bakteri penyebab penyakit ikan.

Diperolehnya isolat bakteri probiotik asli Indonesia yang diisolasi dari ikan kerapu macan, yang akan diaplikasi kepada pakan ikan. Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat mengilhami para nutrisionist dalam menciptakan pakan ikan kerapu yang dapat mengatasi masalah penyakit yang dihadapi para pembudidaya laut dan mempercepat pertumbuhannya, yang nantinya akan dapat membantu permasalahan yang dihadapi oleh para petani-petani ikan terutama ikan kerapu bebek.

4.2. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini mencakup bermacam-macam variabel yang khusus digunakan berdasarkan pada setiap kajian bidang/disiplin ilmu yang meliputi: Uji sensitivitas antara bakteri probiotik yang ditemukan dengan pada ikan kerapu dengan bakteri patogen *Vibrio sp*, *Aeromonas sp*, *Pseudomonas Sp* (Feliatra, 2005), sedangkan

untuk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) purifikasi DNA dan filogenetik molekuler (Radjasa, 2006).

4.3. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Isolasi bakteri probiotik.

Sampel organ usus halus pertengahan dan lambung ikan kerapu bebek dilakukan secara aseptis jangan sampai melukai organ yang akan diambil. kemudian secara aseptis ambil cairan di dalam organ tersebut dengan menusuknya menggunakan jarum ose. Cairan yang diambil dan direndam dengan larutan fisiologis dengan pH 2 yang merupakan parameter utama yang digunakan sebagai bakteri probiotik. kemudian diinokulasi pada media, baik media (Trypton Soya agar) Cawan Petri tersebut dibungkus dengan kertas pembungkus dan diinkubasikan selama 2 x 24 jam pada suhu kamar.

Pemisahan dan pemurnian isolat bakteri.

Pemisahan dan pemurnian isolat bakteri dari karang dilakukan dengan metode goresan (*streak method*). Kultur murni dari isolat bakteri probiotik yang diisolasi dari pencernaan kerapu bebek yang diperoleh dipindahkan ke dalam media Trypton Soya agar 100 mg/l organofosfat agar miring pada tabung reaksi dengan teknik goresan. Pemindahan dan pemeliharaan kultur dilakukan tiap 4 minggu sekali dengan cara mentransfer ke dalam media agar miring yang baru. Kondisi ini harus tetap terjaga agar tidak terkontaminasi bakteri dari udara dan bakteri lainnya selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37 °C.

. Identifikasi Bakteri

Prosedur identifikasi bakteri probiotik dilakukan secara langsung (morfologi) seperti pengamatan bentuk sel, tipe pergendangan sel, warna koloni, ukuran koloni dan tipe koloni. Selain itu dilakukan uji biokimia terhadap bakteri yang tumbuh. Uji morfologi maupun biokimia berdasarkan Alcamo (1983) dan Lay (1994).

1. Pengamatan Sifat Koloni

Isolat yang telah ditumbuhkan pada media agar dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Pengamatan sifat-sifat koloni antara lain adalah ukuran koloni, bentuk atau tipe koloni yang diamati dari dalam, samping dan atas.

2. Pengamatan Bentuk Sel

Bentuk sel bakteri dapat diketahui dengan cara mengamati di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa yang lebih tinggi terhadap preparat pengecatan gram dan uji motilitas. Lensa yang digunakan untuk mengamati sel bakteri ini pada perbesaran 100 x. Sel bakteri diamati secara seksama apakah bentuk bulat, batang, spiral, atau bentuk lainnya.

3. Tipe Pergandengan Sel

Selain pengamatan bentuk sel dan motilitas, preparat diatas dapat digunakan untuk pengamatan terhadap tipe pergandengan sel. Pada mikroskop akan terlihat tipe pergandengan apakah berbentuk rantai, dua-dua sel, tidak beraturan, terpisah-pisah dan sebagainya.

4. Uji pH

Bakteri yang tumbuh pada media agar diuji dengan terlebih dahulu dengan pH 2 dan pH 4. Bakteri yang tumbuh pada media diinokulasi pada tabung yang berisi pH 2 dan pH 4 selanjutnya diinokulasi lagi pada media agar. Bakteri yang tumbuh pada pH 2 dan 4 ini baru dilanjutkan uji-uji selanjutnya

5. Uji Gram (Pewarnaan)

Pewarnaan menurut metode Hucker yaitu sel bakteri yang masih muda (24-48 jam) pada media TSA (Tryptic Soya Agar) dioleskan pada preparat dan dikeringkan dengan cara mengering udarkan serta memanaskan bagian belakang kaca preparat tersebut dengan lampu bunsen. Kemudian preparat disiram dengan larutan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan aquades. Kemudian disiram dengan iodine biarkan 30 detik, lalu dibilas dengan aquades. Etil alkohol 95 % diteteskan pada preparat dan digoyang selama 15 detik, lalu dibilas dengan aquades, setelah itu preparat disiram dengan safranin, didiamkan selama 30 detik, selanjutnya disiram dengan aquades, dikering udarkan dan akhirnya diperiksa dibawah mikroskop. Bakteri gram positif berwarna ungu atau violet sedangkan gram negatif berwarna merah jambu atau kemerah-merahan.

6. Uji Katalase

Untuk menentukan adanya katalase diuji dengan menggunakan larutan 3 % H_2O_2 pada koloni terpisah. Kemudian 1 tetes larutan H_2O_2 diteteskan di atas permukaan koloni. Pada bakteri yang bersifat

katalase positif, terlihat adanya pembentukan gelembung gas di sekitar koloni dan jika gas tidak berbentuk katalase berarti katalase negatif.

7. Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan pada koloni bakteri sampel, koloni bakteri probiotik ditetaskan 3 tetes larutan naptol kemudian ditetesi 3 tetes larutan phenylendiamin. Reaksi bersifat oksidasi positif jika warna koloni berubah dalam waktu dua menit.

8. Uji Motilitas

Penelitian motilitas diuji dengan pengambilan sel bakteri yang masih muda dan dioleskan pada gelas objek, selanjutnya ditetesi dengan immersion oil dan ditutup dengan cover glass serta diamati di bawah mikroskop. Pergerakan bakteri akan terlihat arah dan kecepatannya yang berbeda dengan partikel air.

9. Uji Metil Red

Setelah bakteri yang tumbuh pada media agar diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi dengan media MR-VP kemudian diinkubasi pada suhu 22-25 °C selama 24-48 jam. Langkah selanjutnya ditambahkan 5 tetes indikator metil red pada tabung. Uji positif jika tabung berwarna merah yang berarti asam dan uji negatif jika tabung berwarna kuning dan memproduksi basa.

10. Kemampuan Tumbuh pada Suhu Berbeda

Kemampuan tumbuh masing-masing isolat pada beberapa suhu diuji dengan menumbuhkan isolat pada media agar dan diinkubasi di dalam inkubator pada temperatur 0 °- 5 °C, 15-20 °C dan 25-37 °C selama 2 hari.

11. Sifat Holofilik

Koloni bakteri yang tumbuh pada media diinokulasi ke dalam 4 buah tabung reaksi dengan masing-masing tabung mengandung 1 %, 3 %, 7 % NaCl, kemudian diinkubasi pada suhu 22-25 °C selama 24-48 jam, selanjutnya diamati pada suhu beberapa koloni bakteri tumbuh subur.

Deteksi gen penghasil senyawa bioaktif berbasis PCR

Untuk menskrining adanya gen yang berperan di dalam menghasilkan senyawa bioaktif dalam tiap strain yang positif memberikan hambatan pertumbuhan terhadap

bakteri patogen uji, maka dilakukan dengan teknik PCR. Bahan-bahan yang digunakan antara lain: media agar non selektif TSA (*Tryptone Soya Agar*), kultur bakteri, aquabides, primer

27 F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) dan 1492 R (TACGGYTACCTTGTTACGAC TT), *megamix royal* (MMR), *DNA purification kit*, isopropanol, *loading buffer*, DNA marker, buffer TAE 1 X, agarose gel, ethanol, ethidium bromide. sedangkan pasangan primer spesifik untuk NRPS adalah TSGXTGXPXK dan KAGGAY(LV)P (Marahiel et al, 1997). Sebagai kontrol positif untuk NRPS adalah *Pseudomonas fluorescens* DMS 50117 sedangkan PKS adalah *Bacillus subtilis* strain PKS-I.

4.4.Karakterisasi bakteri probiotik

Karakterisasi bakteri probiotik yang memberikan hasil positif dalam uji hambatan pertumbuhan terhadap bakteri patogen dilakukan secara molekuler yang meliputi tahapan berikut:

Freez and Thaw

Dalam kondisi aseptis, tabung eppendorf 1.5 ml di isi dengan aquabides sebanyak 100 µl. Kemudian kultur bakteri di ambil dengan kawat ose dan di inokulasikan ke dalam tabung eppendorf. Suspensi bakteri tersebut kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga suspensi bakteri mengkristal atau tidak berbentuk cair lagi. Sementara itu, air dipanaskan dalam water bath hingga suhunya mencapai 90 °C. Setelah suspensi mengkristal, tabung eppendorf yang berisi suspensi direndam dalam water bath selama 10 menit. Perlakuan diatas diulangi sebanyak lima kali. Sebelum digunakan, ekstrak DNA disimpan pada suhu – 20 °C.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Untuk reaksi PCR 16S volume 25 µl, tabung eppendorf 0.2 ml di isi dengan aquabides sebanyak 9.5 µl, primer 27 F sebanyak 1 µl, primer 1492 R sebanyak 1 µl, DNA template sebanyak 1 µl, dan megamix royal sebanyak 12.5 µl. Kemudian, tabung eppendorf tersebut dimasukkan kedalam mesin DNA thermal cycler. Program PCR 16S

universal dijalankan dengan pengaturan suhu sebagai berikut: 1 siklus pada suhu 94 °C selama 2 menit dan dilanjutkan 30 siklus dengan suhu 50 °C selama 40 detik, suhu 72 °C selama 1 menit, dan suhu 94 °C selama 40 detik. Kemudian dilanjutkan 1 siklus pada suhu 42 °C selama 1 menit dan suhu 72 °C selama 5 menit dan terakhir 1 siklus pada suhu 4 °C. Untuk menghindari kerusakan bahan selama mempersiapkan sampel, semua bahan diletakkan di dalam *cool box* yang berisi es dan mempergunakan sarung tangan setiap mempersiapkan sampel untuk menghindari kontaminasi.

Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR Pada Gel Agarose

Stock solution buffer TAE 50 X (Tris Acetate EDTA) 1 l disiapkan dengan mencampurkan 242 gr Tris Base, 57.1 ml Asam Asetat Glasial, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) dan dilarutkan dengan aquades steril hingga mencapai volume 1 l. Kemudian gel agarose 1 % (volume 20 ml) disiapkan dengan melarutkan 0.2 gr agarose dalam buffer TAE 1 X dengan cara memanaskan hingga homogen. Setelah homogen, larutan dituangkan kedalam cetakan gel yang telah disediakan. Gel dibiarkan hingga mengeras.

Gel yang telah mengeras dimasukkan kedalam alat elektroforesis. Larutan buffer TAE 1 X dituangkan hingga gel terendam. 5 µl marker DNA disuntikkan ke dalam lubang sumur produk PCR dengan menggunakan mikropipet. Loading buffer bisa digunakan bila diperlukan. Setelah semua sampel disuntikkan, pasang tutup elektroforesis dan alat dijalankan dengan voltase 50 V selama $\pm$ 45 menit atau hingga warna biru produk PCR berada pada setengah bagian gel. Setelah warna biru mencapai 75% dari panjang gel agarose, proses dihentikan dan gel agarose direndam dalam larutan ethidium bromide selama 10 menit. Kemudian gel agarose diletakkan di atas UV transilluminator untuk dilakukan pengamatan band yang terbentuk. Band diamati dan selanjutnya difoto dengan kamera digital.

Purifikasi Gel Elektroforesis

Bahan yang digunakan untuk purifikasi (*High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Diagnostics GmbH, Made in Germany*) terdiri dari tiga larutan yaitu larutan 1 (*Binding Buffer*), larutan 2 (*Washing Buffer*) dan larutan 3 (*Elution Buffer*). Adapun langkah-langkah dalam proses purifikasi adalah sebagai berikut :

Band DNA target dipotong secara utuh (diusahakan sedikit mungkin gel agarose yang terpotong) menggunakan cutter tajam dan steril. Hasil potongan gel agarose yang berisi fragmen DNA target ditampung dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang beratnya sudah ditimbang sebelumnya. Tabung eppendorf yang berisi gel agarose ditimbang kembali untuk mendapatkan berat gel agarose (berat tabung berisi gel dikurangi berat tabung kosong). Larutan 1 ditambahkan ke dalam tabung (setiap 100 mg gel agarose ditambahkan 300 μ l larutan 1). Tabung beserta isinya kemudian diinkubasi dalam waterbath pada suhu 50 $^{\circ}$ C selama 10 menit (tiap 2-3 menit divortex) sampai semua gel agarose mencair. Kemudian ditambahkan dengan isopropanol (dengan perbandingan 3/2 berat agarose). Tabung beserta isinya lalu divortex selama 15 – 30 menit.

Larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung filter yang telah dimasukkan dalam tabung receiver sebelumnya. Larutan dalam tabung kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 detik. Penyaringan dilakukan sampai larutan hasil pengenceran gel agarose habis. Tabung filter mempunyai matriks pengikat DNA yang akan menahan fragmen DNA target. Sedangkan cairan dan kotoran-kotoran akan lolos dan tertampung di dalam tabung receiver. Supernatan dalam tabung receiver dibuang.

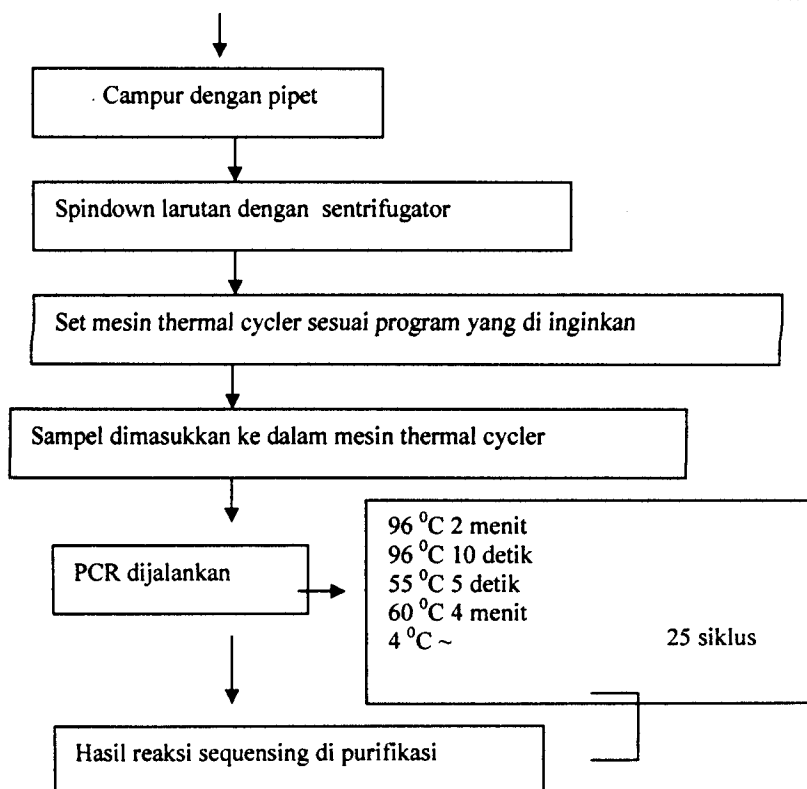
Larutan 2 sebanyak 600 μ l dimasukkan ke dalam tabung filter, lalu disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan dibuang dan tabung filter dipindahkan ke dalam tabung eppendorf steril yang baru.

Larutan 3 sebanyak 25 μl dimasukkan ke dalam tabung filter dan disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 1 menit. Hasil purifikasi DNA (larutan yang tertampung dalam tabung) kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 2 % untuk mengetahui apakah purifikasi telah berhasil atau tidak. Apabila berhasil, hasil purifikasi disimpan dalam lemari pendingin -20°C .

gambar 1. PCR untuk reaksi sequencing menggunakan Bigdye Terminator V.3.1

Campuran berikut ini di buat dalam tabung effendorf 0.2 ml

Solution	Volume kontrol	Volume sampel
Air steril	3 μl	3 μl
Primer	2 μl	1 μl
Big Dye V.3.1	4 μl	4 μl
Template	1 μl	2 μl
Total volume	10 μl	10 μl



Note :

1. Kosentrasi primer untuk PCR cycle sequencing 3.5 pmol
2. Kosentrasi template :
 - a. PCR produk : 10 – 50 ng
 - b. Plasmid : 50 – 250 ng

Sequensing DNA

Hasil purifikasi DNA dikirim ke Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Serpong Tangerang Jakarta untuk dilakukan sequencing dengan menggunakan pewarna *Big Dye Terminator V 3.1* (gambar 1) pada mesin sequencing ABI 3130 XL *Genetik Analyzer Applied Biosistem*.

Analisis Sequen DNA Isolat Bakteri

Hasil sequencing DNA tiap isolat bakteri dibandingkan dengan sekuen DNA pada DNA Database Bank. Penelusuran dilakukan dengan sistem internet, yaitu melalui sistem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang di akses melalui *The World Wide Web* dengan alamat <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Dari penelusuran ini dapat diketahui spesies bakteri, kekerabatannya dan berbagai informasi lainnya

4.5 Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis dengan menggunakan statistik deskriptif maupun parametrik serta paket perangkat lunak (*software*) dari program.

Suhu, salinitas dan kecerahan dianalisis secara deskriptif rerata. Hasil sequencing DNA tiap isolat bakteri dibandingkan dengan sekuen DNA pada DNA Database Bank. Penelusuran dilakukan dengan sistem internet, yaitu melalui sistem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang di akses melalui *The World Wide Web* dengan alamat <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Dari penelusuran ini dapat diketahui spesies bakteri, kekerabatannya dan berbagai informasi lainnya