

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2008. Waktu tersebut termasuk pengambilan sampel udang pada tambak budidaya udang Desa Bantan Air, pengambilan sampel air tambak, dan pengambilan sampel air laut. Isolasi bakteri *Vibrio* dilakukan di Laboratorium Terpadu Jurusan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Selanjutnya, amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan sekuensing DNA dilakukan di Biotech Center, Balai Pengkajian Pengembangan Teknologi (BPPT) di Serpong, Propinsi Banten.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah udang windu, sampel air laut, air tambak, TCBS agar *Merck*, TSA agar *Merck*, TSI agar *Merck*, larutan kristal violet, safranin, iodine, immersion oil, hidrogen peroksida 3% (H_2O_2), tetrametyl-p-phenylendiamine 1 %, alkohol, aquabides, spiritus, NaCl 0,9 %, MR-VP broth, reagent metil red, kultur bakteri, fastPrep® DNA Kit (USA), agarosa, buffer TAE 1x, loading dye 6x, SYBR safe, marker DNA 1 kb DNA Ladder (*Fermentas*;#SM0311/2/3), Taq DNA polymerase, PCR buffer 10x, dNTPs mix, primer 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 765R (5'-CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC-3'), 1114R, (5'-CCCGGAACCCAAAACTTTG-3'), $MgCl_2$ 25 mM.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah: homogenizer *Tomy MS-100R*, mesin sentrifuse *Tomy/MX-301*, Mikropipet Gilson 2-20 μl (seri 05043C) 50-200 μl (seri 05044C) buatan Perancis, PCR thermal cycler (Takara Thermal Cycler Dice-model TP 600 v 2.00), *UV Trans illuminator unit*, *Electrophoresis BioRad*, Gel documentation system, dan *AB 3130 Genetic Analyzer* (lampiran 5).

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah survei, untuk mengetahui dengan melakukan isolasi dan identifikasi morfologi dan kimia *Vibrio* dari udang windu, air

tambak dan air laut di Laboratorium Terpadu Jurusan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Amplifikasi, sekuensing 16S rDNA, dan analisis bioinformatika untuk mengetahui spesies *Vibrio* dilakukan di Biotech Center BPPT Serpong, Banten (lampiran 2).

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel dan Isolasi Bakteri

Sampel udang windu (*Panaeus monodon*) diambil di tambak udang di Desa Bantan Air Kecamatan Bantan Kabupaten Bengkalis sebanyak 10 ekor berumur sekitar 2 bulan. Sampel diambil dengan memperhatikan tingkah laku dan fisik udang. Ciri udang yang diambil yakni bergerak lambat terhadap respon yang diberikan, lemah, dan memiliki warna yang lebih pucat dibandingkan udang yang lain. Udang sampel dimasukkan ke dalam *ice box* sebagai wadah penyimpanan sementara. Untuk sampel air laut dan tambak, pengambilan dilakukan dengan botol ukuran 600 ml pada tambak udang dan air laut di pinggir pantai di Desa Bantan Air. Kedua botol sampel diambil pada siang hari kemudian dimasukkan ke dalam *ice box*.

Lima ekor sampel udang dicuci, dikeringkan, lalu ditimbang. Berat kelima ekor udang adalah 46,4 gram dan diencerkan kedalam 417,6 ml air laut yang sudah steril (perbandingan 1 : 9), dan ini merupakan pengenceran pertama (10^{-1}). Setelah homogen, larutan sampel udang dan air laut tersebut diencerkan lagi dalam tabung reaksi sampai pengenceran ketiga (10^{-2} , dan 10^{-3}), dengan cara 1 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl 0,9 % (10^{-2}). Tabung reaksi pengenceran kedua (10^{-2}) digoncang hingga merata, kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran ketiga (10^{-3}) yang sudah terisi 9 ml larutan NaCl 0,9% dan dihomogenkan.

Pengenceran sampel air tambak dilakukan sama dengan pengenceran pada sampel udang. Demikian pula untuk sampel air laut. Selanjutnya dilakukan penanaman bakteri pada media TCBS yang diambil 1 ml dari pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} untuk masing-masing sampel pada cawan petri yang telah disiapkan dengan media TCBS.

Koloni yang tumbuh direinokulasi pada media yang baru. Setiap koloni

berbeda yang diperoleh direinokulasi sebanyak tiga ulangan menggunakan media TSA. Penyimpanan isolat bakteri *Vibrio* dilakukan pada suhu 4 °C dalam refrigator dan siap untuk digunakan pada pengujian selanjutnya. Selama penyiapan cawan petri dibungkus dengan plastik agar tidak terkontaminasi dengan bakteri dari luar.

3.4.2. Identifikasi Bakteri

Pengamatan yang dilakukan secara langsung diidentifikasi (secara morfologi) seperti pengamatan bentuk sel, warna koloni, ukuran koloni dan tipe koloni. Selain itu, uji coba biokimia juga dilakukan terhadap uji bakteri. Uji morfologi maupun uji biokimia berdasarkan Alcamo (1983) dan Lay (1994).

3.4.2.1. Pewarnaan Gram

Koloni yang tumbuh pada media agar TCBS dioleskan pada kaca preparat dan dikeringkan. Selanjutnya preparat disiram larutan *crystal violet*, didiamkan selama 1 menit, dan disiram dengan air. Kemudian preparat disiram dengan larutan iodin, didiamkan selama \pm 1 menit, dibilas dengan air. Etil-alkohol 95% diteteskan pada preparat dan digoyang-goyang selama 15 detik, setelah kering diteteskan lagi dengan etil-alkohol 95% dan digoyang-goyang selama 15 detik, lalu dicuci dengan air. Kemudian disiram dengan larutan *safranin*, dibiarkan selama 30 detik lalu dicuci dengan air dan dikeringkan dengan kertas saring. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop. Bakteri gram positif berwarna ungu atau violet, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah jambu atau kemerahan.

3.4.2.2. Pertumbuhan pada Medium TSI Agar

Koloni pada mediaum TCBS diinokulasikan pada tabung reaksi yang masing-masing berisi media agar TSI tegak dan miring. Tabung-tabung reaksi tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Fermentasi glukosa dilihat oleh warna kuning pada agar miring dan merah pada agar tegak. Jika kedua tabung berwarna kuning berarti terjadi fermentasi laktosa dan sukrosa. Produksi gas diperlihatkan dengan adanya rongga pada media. Adanya warna kehitaman menunjukkan adanya produksi gas H₂S.

3.4.2.2. Uji Katalase

Penentuan adanya katalase diuji dengan satu tetes larutan 3% H₂O₂ (Hidrogen peroksida) ditambahkan pada suhu koloni yang terpisah. Adanya produksi katalase, dilihat dari gelembung gelembung gas yang diproduksi oleh koloni tersebut.

3.4.2.3. Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan pada koloni bakteri sampel, dengan meneteskan 3 tetes larutan naptol kemudian ditetesi 3 larutan Phenylendiamin. Reaksi positif jika warna koloni berubah dalam waktu dua menit.

3.4.2.4. Uji Metil Red

Koloni diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi 1,5% MR-VP Media. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam-28 jam, tabung kontrol tanpa inokulasi disertakan pula. Selanjutnya ditambahkan lima tetes indikator merah metil pada tabung inokulasi MR-VP media. Kriteria positif apabila media berwarna merah dan tes negatif apabila media berwarna kuning.

3.4.3. Isolasi DNA *Vibrio*

Kultur cair dari sampel bakteri disentrifuse menggunakan *Homogenizer Tomy MS-100R*, hingga didapat pellet 50-100mgr. Sampel dimasukkan ke dalam lysing matrix, lalu ditambahkan 1000µL CLS TC. Homogenisasi sampel dengan *FastPrep instrument* selama 40 detik pada kecepatan 4500 rpm dengan mesin *Sentrifuse Tomy/MX-301*. Setelah homogen, sampel diinkubasi dalam wadah es selama 2 menit. Sampel kembali disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 14.000 xg. Supernatan dari tabung diambil 600-700 µl ke tabung eppendorf 1,5 ml yang baru. Pada tube yang baru, ditambahkan 600 µl Binding matrix dan di-*taping* dengan pipet secara hati-hati. Diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang lalu disentrifugasi selama satu menit pada kecepatan 14.000 xg. Supernatan dibuang. Pellet diresuspensi dengan ditambahkan 500 µl SEWS-M dan kembali disentrifuse selama 1 menit kecepatan 14.000 xg. Untuk mengelusi DNA, 50µL supernatan yang mengandung DNA ke tube

1,5 ml yang baru. Simpan DNA pada suhu 4 °C.

3.4.4. Reaksi Polimerisasi Berantai

Empat komponen utama dalam PCR yaitu: 1). DNA *template* (cetakan), yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan; 2). Oligonukleotida *primer*, yaitu suatu sekuenoligonukleotida pendek (15-25 nukleotoda) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA; 3). Deoksiribonukleotida trifosfat (*dNTP mix*), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 4). Enzim polimerase, yaitu enzim yang digunakan untuk melakukan katalis reaksi sintesis rantai DNA.

Untuk reaksi PCR 16S volume 25 µl, tube *appendorf* 0,2 ml diisi dengan air sebanyak 36,75 µl, PCR Long Buffer 10x+MgCl₂ 5 µl, primer (9F/765F/1114R) sebanyak 1 µl, DNA template sebanyak 2 µl, dan dNTP mix 4 µl, taq polymerase 0,25 µl. Kemudian tube *appendorf* tersebut dimasukkan ke dalam mesin DNA thermal cycler. Program PCR 16S universal dijalankan dengan pengaturan suhu sebagai berikut: 1 siklus pada suhu 94 °C selama 2 menit (denaturasi), dilanjutkan 30 siklus dengan suhu 50 °C selama 40 detik (*annealing*), perpanjangan rantai (sintesis DNA) pada 72 °C selama 1 menit, dan suhu 94 °C selama 1 menit. Siklus lalu diulang sebanyak 25 kali. Pada siklus terakhir dilakukan pemanjangan rantai lebih lama pada suhu 72 °C selama 5 menit dan disimpan pada suhu 4 °C. Untuk menghindari kerusakan bahan selama mempersiapkan sampel, semua bahan di dalam *coolbox* yang berisi es dan menggunakan sarung tangan setiap mempersiapkan sampel untuk menghindari kontaminasi.

3.4.5. Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR

Sebelum elektroforesis, agarose ditimbang dengan perbandingan 1% (w/v) dengan larutan buffer TAE 1x.. Buffer TAE 1x dengan volume 50 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambah dengan agarose yang telah ditimbang. Campuran dalam erlenmeyer dipanaskan dengan microwave sampai larut dan homogen. Setelah dikeluarkan dari microwave, kira-kira pada suhu 40-50 °C, CYBER SAFE 10.000x ditambahkan, lalu digoncang-goncang hingga larutan homogen. Larutan ini lalu

dituang ke cetakan yang telah dipasang sisir untuk membuat gel berlubang dan tidak boleh ada gelembung gas. Setelah beku, sisir dilepas lalu cetakan bersama gel beku dimasukkan ke dalam wadah/ bak elektroforesis dan direndam keseluruhan dalam buffer TAE 1x. Masing-masing lubang pada gel dimasukkan marker DNA (loading dye 6x). Switch dinyalakan dengan tegangan 100 V selama 30 menit.

Gel yang berisi visualisasi fragmen DNA diangkat lalu diletakkan di atas UV Trans Illuminator, dan didokumentasikan menggunakan *Gel documentation System* yang terhubung langsung dengan komputer.

3.4.6. Purifikasi Gel Elektroforesis

Bahan yang digunakan untuk purifikasi (*Kit High Pure PCR Product Purification, Roche Diagnostic GmbH, made in Germany*), terdiri dari tiga larutan, yaitu larutan 1 (*Binding Buffer*) yang berfungsi mencairkan gel agarose; larutan 2 (*Washing Buffer*) untuk mencuci DNA; dan larutan 3 (*Elution Buffer*) untuk melepaskan DNA dari matriks pengikat DNA. Purifikasi dilakukan pada gel elektroforesis berkonsentrasi 1 %.

Tabung 1,5 ml kosong yang akan digunakan ditimbang. Gel agarose yang mengandung fragmen DNA dipotong, lalu dimasukkan ke tabung yang sudah ditimbang. Tabung yang sudah berisi gel kembali ditimbang. Selisih berat tabung yang berisi gel dengan berat kosong (berat gel \pm 300mg) dihitung. Lalu ditambahkan 500 μ L buffer (larutan 1) pada sampel dan campur dengan cara divorteks. Inkubasi pada 55-60⁰ C selama 10-15 menit sampai semua agarosa larut (bolak-balik tabung setiap 2-3 menit).

Setelah gel larut, sampel didinginkan hingga suhu ruang. DF kolom ditempatkan pada tabung 2 ml. Sampel dipindahkan ke DF kolom (lebih dari 700 μ L), lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.

Buang larutan dari tabung 2 ml kemudian tempatkan kembali DF kolom pada tabung 2 ml. 600 μ L *wash buffer* (larutan 2) ditambahkan, lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Larutan dibuang dari tabung 2 ml, kemudian tempatkan kembali DF kolom pada tabung 2 ml. Kembali disentrifugasi pada

kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. DF kolom dipindahkan ke tabung 1,5 ml yang baru. DNA dielusi dengan menambahkan 15-50 μ l *elution buffer* (larutan 3) di tengah-tengah membran DF kolom, lalu diinkubasi selama 2 menit. Disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit lalu DNA disimpan pada suhu 4 $^{\circ}$ C.

3.4.7. Sekuensing dan Analisis BLAST

Hasil purifikasi DNA disekuensing dengan menggunakan ABI 3130 XL *Genetic Analyzer Applied Biosistem*. Pada tahap sekuensing, semua tube 0,2 ml yang berisi sampel-sampel DNA yang telah dipurifikasi dimasukkan ke dalam mesin *AB 3130 Genetic Analyzer*. Sekuensing dijalankan dengan komputer menggunakan software *AB 3130* (lampiran 2). Metode sekuensing ini berdasarkan metode yang diterapkan oleh Lusiano (2007) dan Handayani (2008).

Analisis BLAST dilakukan dengan mengedit urutan DNA hasil sekuensing dengan menterjemahkan N menjadi basa sesuai elektroferogram. Urutan DNA dicopy ke program Notepad. Lalu dilakukan penelusuran melalui website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Lampiran 3).

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil sekuensing dianalisis menggunakan teknik BLAST, paket program Clustal X, Genedoc, Treeview dan Bioedit. Kemudian hasil analisis disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar.

Alignment (penyejajaran) sekuens sampel dengan sekuens dari data base semua DNA *Vibrio* yang diteliti dilakukan menggunakan program *alignment* dari paket Clustal X. Untuk memperoleh dendogram digunakan program N-J pada Clustal X dengan tingkat 100 x bootstrap.