

## BAB 4

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian

Berdasarkan sifat permasalahannya, maka jenis penelitian adalah penelitian eksploratif.

#### 4.2 Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Sampel penelitian adalah tanah yang diambil dari ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dengan kriteria daerah yang diasumsikan mengandung pencemaran tinggi dan pantai utara Probolinggo yang diasumsikan mengandung pencemaran rendah.

Teknik pengambilan sampel tanah yaitu dari masing-masing lokasi pengambilan sampel diambil 5 titik sampling daerah target dan dicampur. Cara pengambilan sampel tanah adalah menggunakan alat metal silindris steril (panjang 5,5 cm dengan diameter 5 cm). Metal silindris steril diletakkan pada permukaan tanah dan ditekan hingga kedalaman  $\pm$  5-10 cm. Sampel tanah yang diperoleh dimasukkan ke dalam botol steril.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti adalah (1) *Streptomyces* penghasil antibiotik dari isolat tanah ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya yang mengandung pencemaran tinggi dan pantai utara Probolinggo yang mengandung pencemaran rendah. Masing-masing lokasi diambil 5 titik sampling dengan 3 replikasi, (2) profil aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.

isolat tanah ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis*), bakteri Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*), (3) profil sekuen gen 16S rRNA *Streptomyces* penghasil antibiotik isolat tanah ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo.

#### 4.3.1 Definisi operasional variabel

*Streptomyces* adalah isolat yang mampu menghasilkan antibiotik yang diperoleh dari tanah ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya yang mengandung pencemaran tinggi dan pantai utara Probolinggo yang mengandung pencemaran rendah melalui penapisan dengan metode lempeng Agar.

Profil aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp. adalah aktivitas *Streptomyces* sp. terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis*), bakteri Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*) dengan metode difusi modifikasi cetak Agar yang menghasilkan zona hambatan.

Sekuen gen 16S rRNA *Streptomyces* sp. adalah susunan nukleotida gen 16S rRNA *Streptomyces* penghasil antibiotik pada 800-1500 bp yang diperoleh dari hasil sekuensing dengan metode terminator rantai/dideoksi ABI Prism 310 yang merupakan pengembangan dari metode Sanger. Analisis sekuen DNA berdasarkan urutan polipeptida sekuen DNA yang kemudian dibandingkan dengan bank gen data dari sekuen lain dan dibuat diagram

pohon filogenetik dengan menggunakan program *Sci Ed Central, Clone Manager Profesional Suite, Scientific and Educational Software* 1994-2000.

#### 4.4 Bahan Penelitian

Tanah *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan pantai utara Probolinggo, dapar fosfat pH 7, air suling, etanol, kristal violet, safranin, larutan iodin, alkohol, aseton, minyak imersi, ISP-4 (*International Streptomyces Project-4*), NA (*Nutrien Agar*), bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis*), bakteri Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*), arabinosa, laktosa, xilosa, manitol, sakarosa, amilum, *cell suspension solution*, *RNase mixx*, *cell lysis*, *protease mixx*, *salt-out mixture*, dapar TE, ethanol absolut, dapar Tris pH 7,5; EDTA, foward pA 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', reverse pH 5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3' , *master mix*, *destilated water*, agarose (Gibco BRL, no. cat 15510-019), TBE, EtBr (*ethidium bromide*), *loading buffer*, *DNA marker*, ET-OH 96%, dapar PE, dapar PB, dan dapar EB.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah (1) metal silindris, (2) otoklaf, (3) mikroskop Olympus U-SRE-2, (4) *homogenizer*, (5) *Shaker Gerhad* Laboshake, (6) pH meter, (7) fermentor, (8) *PCR Perkin Elmer Thermal Cycler* 480, (9) elektroforesis, (10) lampu UV, (11) *sentrifuge*, (12) mikropipet, (13) vortex, (14) *parafilm*, (15) tabung Eppendorf, (16) timbangan analitik Sartorius, (17) dan sekuenser *ABI Prism* 310.

## 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian adalah ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Fakultas Kedokteran Bagian Mikrobiologi Universitas Airlangga, dan TDC (*Tropical Disease Center*) Universitas Airlangga Surabaya.

Waktu penelitian adalah tahun 2006-2007.

## 4.7 Prosedur Pengambilan Data

### 4.7.1 Pengambilan Sampel (Alexander and Strete, 2001; Demain and Nadine, 1986)

Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan alat metal silindris steril (panjang 5,5 cm diameter 5 cm) pada ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo. Masing-masing lokasi diambil 5 titik daerah pengambilan sampel dan dicampur menjadi satu.

Metal silindris diletakkan pada permukaan tanah dan ditekan hingga kedalaman  $\pm$  5-10 cm. Sampel tanah dari masing-masing lokasi dimasukkan ke dalam botol steril.

### 4.7.2 Isolasi *Streptomyces* sp. dari Tanah (Alexander and Strete, 2001; Demain dan Nadine, 1986)

Ditimbang sebanyak 10 gram tanah dimasukkan dalam 90 mL dapar fosfat pH 7 dan dihomogenkan. Suspensi yang diperoleh diambil 1 mL menggunakan mikropipet, kemudian dilakukan pengenceran dengan menambahkan 9 mL larutan dapar fosfat pH 7 ( $10^{-1}$ ) ke dalam tabung reaksi, kemudian dibuat pengenceran hingga  $10^{-3}$ . Masing-masing pengenceran diambil 1 mL menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri

steril ditambah 10 mL medium ISP-4 Agar yang telah dicairkan pada suhu 45°C, kemudian diinkubasikan pada suhu 28°C selama 2-4 hari.

#### **4.7.3 Pengamatan Isolat *Streptomyces* sp. secara Makroskopis (Alexander and Strete, 2001)**

Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan cara menentukan jenis koloni *Streptomyces* dengan ciri-ciri : koloni kecil dengan diameter 2–3 mm, berbulu halus, bentuk seperti kulit dan keras, spora di ujung miselia udara, koloni berbentuk butiran serbuk, granula, atau beludru, membentuk macam pigmen, dan memberikan bau tanah.

#### **4.7.4 Pemurnian isolat *Streptomyces* sp. (Alexander and Strete, 2001)**

Dari bermacam-macam koloni yang tumbuh di media isolasi diambil 1 Öse koloni yang mempunyai karakter *Streptomyces* sp., kemudian ditanam pada media ISP-4 padat pada cawan petri, dan diinkubasikan selama 4 hari pada suhu 28°C. Setelah *Streptomyces* sp. tumbuh, kemudian dipindahkan pada media ISP-4 agar miring. Untuk proses selanjutnya menurut Davelos *et al.*, (2004) bahwa isolat *Streptomyces* sp. harus disimpan pada media ISP-4 cair yang mengandung gliserol 20% dengan suhu -80°C agar isolat tidak mengalami perubahan morfologi dan fisiologi.

#### **4.7.5 Penapisan aktivitas antibiotik *Streptomyces* sp. (Alexander and Strete, 2001)**

Disiapkan cawan petri, diisi media ISP-4 Agar 15 mL yang telah dicairkan pada suhu 45°C. Setelah padat, digoreskan koloni *Streptomyces* sp. sepanjang 1 cm dan diinkubasi selama 48 jam.

Disiapkan inokulum mikroba uji. Masing-masing sebanyak 1  $\times$  koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* dibiakkan dalam 10 mL kultur media *Nutrien Agar* miring dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam, kemudian diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam.

Mikroba uji yang telah diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam ditambahkan larutan steril dapar fosfat pH 7 kemudian dikocok sampai seluruh koloni di permukaan Agar lepas dan tersuspensi dalam larutan dapar fosfat pH 7. Inokulum tersebut selanjutnya diukur transmittannya pada panjang gelombang 580 nm dengan *Spectronic 20*. Transmittan suspensi diatur agar mencapai transmittan 25%. Apabila transmittan menunjukkan kurang dari 25% maka suspensi diencerkan dengan menambahkan larutan bufer fosfat dan apabila transmittan menunjukkan lebih dari 25% maka ditambahkan lagi koloni bakteri.

Selanjutnya diambil masing-masing 10  $\mu$ L inokulum *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* yang mempunyai T = 25% dan dimasukkan pada 10 mL media NA, selanjutnya dituang ke atas petri yang telah mengandung koloni *Streptomyces* sp. Diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam. Uji awal potensi antibiotik *Streptomyces* sp. dilakukan sebanyak 2 replikasi.

Hasil positif ditandai adanya zona hambatan disekitar koloni biakan pada cawan petri yang berarti bahwa isolat *Streptomyces* sp. mampu menghasilkan antibiotik, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri.

#### **4.7.6 Identifikasi Isolat *Streptomyces* sp. secara Mikroskopis (Alexander and Strete, 2001)**

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan cara mengambil 1 *Ö*se koloni *Streptomyces* sp. dengan *inokulating loop* steril dan diletakkan pada obyek gelas yang berisi air steril, diamati di bawah mikroskop Olympus U-SRE-2 dengan perbesaran 100-400X dengan menambahkan minyak imersi.

#### **4.7.7 Pewarnaan Gram (Forbes et al., 1998)**

Diambil koloni *Streptomyces* sp. dan diletakkan di atas gelas obyek. Koloni diwarnai dengan kristal violet selama 30 detik. Larutan kristal violet dihilangkan dengan air. Ditambahkan larutan iodium selama 30 detik untuk meningkatkan afinitas kristal violet. Larutan iodium dihilangkan dan dialiri dengan air. Ditambahkan alkohol selama 10-20 detik dan selanjutnya dicuci dengan air mengalir sampai warna biru hilang. Ditambahkan safranin selama 30 detik. Safranin dihilangkan dengan air mengalir dan sisa-sisa air dibersihkan dengan kertas saring. Sediaan diletakkan di bawah mikroskop perbesaran 100-400X dengan ditambahkan minyak imersi dan bentuk koloni diamati.

#### **4.7.8 Uji karbohidrat (Jun, et al., 2003)**

Pada uji ini digunakan enam macam karbohidrat yaitu (1) arabinosa, (2) laktosa, (3) xilosa, (4) manitol, (5) sakarosa, dan (6) amilum. Uji gula dilakukan untuk mengetahui apakah isolat *Streptomyces* sp. yang didapatkan mampu menggunakan gula untuk pertumbuhan. Sebanyak satu *Ö*se biakan *Streptomyces* sp. digoreskan di atas permukaan Agar yang mengandung sakarida sebagai sumber karbohidrat (arabinosa, laktosa, xilosa, manitol,

sakarosa, dan amilum). Sebagai kontrol, media tidak ditambahkan sakarida. Biakan diinkubasi pada suhu 28<sup>0</sup>C selama 48 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya pertumbuhan *Streptomyces* sp. pada media tersebut sebagai akibat kemampuan *Streptomyces* sp. menggunakan gula tersebut untuk media pertumbuhan.

#### **4.7.9 Uji Aktivitas Antibakteri**

##### **4.7.9.1 Pemiakan *Streptomyces* sp. (Alexander and Strete, 2001)**

Diambil 1 Öse biakan *Streptomyces* sp. dari agar miring dan dipindahkan pada media ISP-4 cair 10 mL, kemudian dikocok menggunakan *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (*Rotation per minute*) pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 2-4 hari. Diambil 2,5 mL dengan mikropipet dan dipindahkan pada 25 mL media ISP-4 cair dan dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30<sup>0</sup>C. Setelah 6 jam diambil 3 mL dan disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dua kali dengan dapar fosfat pH 7 dan disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit. Ditambahkan 50 mL dapar fosfat pH 7 pada sel yang telah tercuci tersebut.

Diambil 5 mL suspensi sel dan dicampur dengan 15 mL media ISP-4 Agar yang telah dicairkan pada suhu 45<sup>0</sup>C, kemudian diinkubasi pada suhu 28<sup>0</sup>C. Dari media yang telah berisi *Streptomyces* sp. dicetak dengan diameter 0,8 cm dan tinggi 3 mm. Diambil setiap periode 24 jam selama 10 hari untuk diletakkan di atas media uji untuk uji potensi.

#### **4.7.9.2 Penanaman bakteri uji (Alexander and Strete, 2001)**

Masing-masing sebanyak 1 Öse koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* dibiakkan dalam 10 mL kultur media *Nutrien Agar* miring dan diinkubasikan pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 24 jam.

#### **4.7.9.3 Penyiapan inokulum bakteri uji (Alexander and Strete, 2001)**

Bakteri uji yang telah diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 24 jam ditambahkan 10 mL larutan steril dapar fosfat pH 7, kemudian dikocok sampai seluruh koloni di permukaan Agar lepas dan tersuspensi dalam larutan dapar fosfat pH 7. Inokulum tersebut selanjutnya diukur transmittannya pada panjang gelombang 580 nm dengan *Spectronic 20*. Transmitan suspensi diatur agar mencapai transmitan 25%. Apabila transmitan menunjukkan kurang dari 25%, maka suspensi diencerkan dengan menambahkan larutan dapar fosfat dan apabila transmitan menunjukkan lebih dari 25%, maka ditambahkan lagi koloni *Streptomyces* sp.

#### **4.7.9.4 Penyiapan standar uji (Isnaeni, 1998)**

Sebagai kontrol untuk bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* digunakan 10 µL streptomisin sulfat 250 ppm (25 mg dalam 100 mL air steril) yang diletakkan dalam sumur (diameter 0,8 cm; tinggi 3 mm) pada media NA yang mengandung bakteri uji.

#### **4.7.9.5 Penyiapan media uji (Alexander and Strete, 2001)**

Disiapkan cawan petri dengan menambahkan media *Nutrien Agar* 15 mL sebagai *base layer*. Selanjutnya diambil masing-masing 10  $\mu$ L inokulum *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* yang mempunyai T = 25% dan dimasukkan pada 10 mL media *Nutrien Agar* sebagai *sheed layer*.

#### **4.7.9.6 Uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp. (Alexander and Strete, 2001; Demain dan Nadine, 1986)**

Uji aktivitas dilakukan dengan menempelkan hasil cetakan agar yang ditumbuhi *Streptomyces* sp. pada media yang telah diinokulasi dengan bakteri uji, kemudian diinkubasikan pada suhu 28<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, diukur zona hambatan yang terbentuk di sekitar koloni biakan dengan jangka sorong. Sebagai kontrol untuk mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* digunakan 10  $\mu$ L streptomisin sulfat 250 ppm (25 mg dalam 100 mL) yang diletakkan dalam sumur (diameter 0,8 cm; tinggi 3 mm) pada bakteri uji. Replikasi uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp. dilakukan sebanyak 3 kali.

Hasil positif ditandai adanya zona hambatan di sekitar koloni biakan pada cawan petri yang berarti bahwa isolat *Streptomyces* sp. mampu menghasilkan antibiotik, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

#### 4.7.9.7 Analisa data uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.

Diameter zona hambatan (mm) yang dihasilkan selama 10 hari dengan interval waktu 24 jam, dibuat kurva yang menyatakan hubungan antara waktu inkubasi *Streptomyces* sp. dengan diameter zona hambatan (mm).

Dari kurva tersebut dapat diketahui waktu awal (*onset of action*), aktivitas antibakteri, lama aktivitas antibakteri, dan besarnya produksi antioitk yang dihasilkan.

#### 4.8 Isolasi DNA *Streptomyces* sp. (Ausubel et al., 1995)

Diambil 1 Öse biakan *Streptomyces* sp. dari agar miring dan dipindahkan pada media ISP-4 cair 10 mL, kemudian dikocok menggunakan *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (*Rotation per minute*) pada suhu 30°C selama 2-4 hari. Kemudian diambil 2,5 mL dengan mikropipet dan dipindahkan pada 25 mL media ISP-4 cair, kemudian dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C selama 2 hari. Setelah 6 jam diambil 3 mL sampel dan disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci sebanyak dua kali dengan dapar fosfat pH 7 pada 6.000 rpm selama 10 menit. Ditambahkan 50 mL dapar fosfat pH 7 pada sel yang telah tercuci tersebut.

Isolasi DNA *Streptomyces* sp. dilakukan dengan menggunakan kit Qiagen. Sebanyak 1 mL suspensi sel *Streptomyces* sp. dimasukkan ke dalam *cell suspension solution* kit dengan volume akhir 1,85 mL dan dihomogenkan. Ditambahkan sebanyak 50 µL *RNase mix kit* dan dicampur dengan cara dipipet dengan hati-hati, kemudian ditambahkan 100 µL *cell lysis kit* dan diinversi 2-5 kali. Campuran diinkubasikan pada suhu 55°C selama 15 menit,

ditambah 25  $\mu\text{L}$  *protease mix* dan dicampur merata, selanjutnya diinkubasi pada suhu 55 $^{\circ}\text{C}$  selama 30-120 menit, ditambah 500  $\mu\text{L}$  *salt-out mixture kit*, didinginkan selama 10 menit pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$  dan dimikrosentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Secara hati-hati pelet dibuang, kemudian supernatan dimasukkan pada tabung konikal steril 15 mL, ditambah 2 mL dapar TE dan 8 mL etanol absolut. Campuran pada tabung diinversi sampai terlihat benang halus DNA, disentrifugasikan pada 10.000 rpm selama 2 menit dan etanol dibuang dengan hati-hati. Tabung dikeringkan pada konsentrator, atau dibalikkan pada *tissue* bersih selama 10-15 menit, kemudian DNA genom dilarutkan dalam TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA). Selanjutnya DNA disimpan pada suhu 2-8 $^{\circ}\text{C}$ . Sebelum digunakan jika pada cairan stok terdapat endapan, maka dipanaskan pada suhu 60 $^{\circ}\text{C}$  agar larut.

#### 4.8.2 Amplifikasi PCR 16S rRNA *Streptomyces* sp. (Ausubel et al., 1995)

Primer yang digunakan adalah Sigma Proligo dengan urutan :

*forward* pA 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

dan *reverse* pH 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (Davelos, A.L., et al., 2004).

Amplifikasi dilakukan dengan campuran *reagen* sebagai berikut : 25  $\mu\text{L}$  *master mix kit*, primer *forward* 2  $\mu\text{L}$ , primer *reverse* 2  $\mu\text{L}$ , *destilated water* 11  $\mu\text{L}$ , DNA 10  $\mu\text{L}$  sehingga didapatkan total reaksi 50  $\mu\text{L}$ . Denaturasi awal 95 $^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Melakukan amplifikasi sebanyak 35 daur : denaturasi 95 $^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *annealing* 60 $^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *elongasi* 72 $^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit. Pada putaran yang ke 35 *post elongasi* 72 $^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit.

Digunakan sebagai kontrol positif adalah DNA dari *Streptomyces griseus* ATCC 10971 dan kontrol negatif adalah tanpa menggunakan DNA.

#### **4.8.3 Elektroforesis Produk PCR (Ausubel et al., 1995)**

Dilarutkan 0,4 Gram agarose (Gibco BRL, no. cat 15510-019) dalam 20 mL TBE 0,5X untuk mendapatkan gel agarose 2%. Larutan agarose dipanaskan sampai mendidih dan cetakan disiapkan. Sisir elektroforesis ditempatkan untuk membentuk sumur gel. Setelah mendidih, larutan agarose didiamkan sampai suhu 60°C kemudian ditambah 0,5 µL/mL larutan EtBr (*ethidium bromide*). Larutan agarose dituang ke cetakan dan dibiarkan hingga membeku. Setelah membeku, penutup cetakan dan sisirnya diangkat. Cetakan ditempatkan pada elektroforesis yang telah berisi dapar TBE 0,5X. 8 µL larutan produk PCR dimasukkan dan ditambah 2 µL dapar *loading* ke dalam sumur elektroforesis. DNA *marker* juga dimasukkan ke dalam salah satu sumur. Elektroforesis dijalankan pada 100 V selama 20 menit dan hasil elektroforesis dilihat dibawah sinar UV dan difoto.

#### **4.8.4 Purifikasi DNA (Ausubel et al., 1995)**

Produk PCR dipurifikasi dengan *QIA quick PCR Purification Kit*. Ditambahkan ET-OH 96% pada dapar PE. Ditambahkan dapar PB (5 X volume) ke dalam hasil produk PCR. Sampel diletakkan pada *QIA Quick spin column* (2 mL *colect tube*) dan disentrifugasi selama 30-60 detik (untuk mengikat DNA). Setelah *flow through* dibuang, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan maksimal 15.000 rpm selama 1 menit. Bagian atas diambil,

dipindah ke tabung 1,5 mL steril dan ditambah dapar EB pada bagian sentral membran, dibiarkan selama 1 menit kemudian disentrifugasi selama 1 menit.

#### **4.8.5 Sekuensing DNA**

*Template* untuk sekuensing adalah DNA produk PCR yang telah dimurnikan. Sekuensing dilakukan dengan metode Sanger yaitu terminator rantai/dideoksi menggunakan sekuenser *ABI Prism 310*. Dilakukan pelabelan dengan *big dye*. Volume yang digunakan adalah 150  $\mu\text{L}$  dengan konsentrasi 200 ng/mL. Untuk pembacaan hasil, sampel *diloading* dalam semua sumuran pada mesin *Sequencer ABI Prism 310* dengan volume 1,5  $\mu\text{L}$ . Hasil sekuensing dapat dilihat dalam beberapa jam melalui monitor dalam bentuk grafik alogram dan hasilnya dapat dicetak. Untuk analisis sekuen DNA dilakukan dengan menggunakan *software computer Genetic Mac Version 8,0*.