

3. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Secara keseluruhan waktu dilaksanakannya penelitian ini pada bulan Februari hingga bulan September 2017, yang mana dibagi menjadi dua tahapan. Pada tahapan pertama yaitu mengenai isolasi dan skrining bakteri yang menghasilkan enzim gelatinase yang dilaksanakan pada bulan Februari hingga bulan Mei 2017, bertempat di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya, Malang. Kemudian pada tahap kedua yaitu mengenai identifikasi bakteri menggunakan sekuensing 16S rDNA yang dilaksanakan pada bulan Juni – Agustus 2017 bertempat di Laboratorium Genetik dan Mikrobiologi Fakultas Sains Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Dan untuk pewarnaan gram bakteri dilaksanakan pada bulan September 2017 yang bertempat di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Tempat pengambilan sampel di Pantai Panggungrejo, Kelurahan Bugulkidul, Kota Pasuruan, Jawa Timur.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : timbangan digital dengan ketelitian 0,01 g, timbangan analitik dengan ketelitian 0,001 g, autoklaf, pipet volume ukuran 10 mL, pipet serologis ukuran 1 mL, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *hot plate*, nampan, sendok, gunting, sarung tangan, masker, lampu bunsen, gelas ukur ukuran 100 mL, *sprayer*, *washing bottle*, *sprayer*, inkubator, lemari pendingin (kulkas), *waterbath*, jarum ose, jarum loop, *vortex mixer*, laminaran *air flow*, spidol, panci, kompor, corong, korek api, beaker glass ukuran 500 mL, erlenmeyer ukuran 250 dan 1000 mL, *coolbox* dan kamera.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah NaFis (9 g NaCl dalam 1 liter akuades), Media LBA (yeast ekstrak 5 g, pepton 10 g, NaCl

10 g, agar 15 g, dalam 1 liter akuades), anti jamur 0,005 g/ 100 mL media LBA, media gelatin (pepton 5 g, *beef extract* 3 g, gelatin 120 g, dalam 1 L akuades), sampel sedimen pantai Panggungrejo Pasuruan, *aluminium foil*, kapas, benang kasur, *plastic wrap*, es batu dan plastik PP.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian merupakan suatu cara untuk mengumpulkan data penelitian yang dilakukan peneliti saat menyusun laporan penelitian. Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan saat melakukan pemilihan metode penelitian, antara lain: sumber data, waktu, dana penelitian, jumlah tenaga peneliti, teknik pengolahan data yang akan digunakan saat penelitian dan objek penelitian (Arikunto, 2006). Dan pada ada penelitian ini menggunakan metode penelitian secara eksploratif deskriptif.

Metode penelitian eksploratif adalah suatu metode yang bertujuan untuk mencari data sebanyak-banyaknya guna mengetahui hubungan-hubungan baru dari suatu permasalahan yang kompleks atau luas. Sedangkan metode penelitian deskriptif adalah suatu jenis metode yang bertujuan untuk menjelaskan atau mendeskripsikan suatu kejadian yang saat ini sedang berlangsung dengan mencari berbagai informasi dan variabel yang berkaitan dengan kejadian tersebut. Kedua metode penelitian ini sama-sama tidak melakukan pengujian hipotesa karena terlalu kompleksnya data yang digunakan dan hanya digunakan untuk mendeskripsikan suatu permasalahan yang ada (Mardalis, 2008).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penelitian Pendahuluan (Tahap I)

Adapun pada penelitian pendahuluan yang dilakukan pada Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya, Malang terdapat beberapa tahapan sebagai berikut:

A. Pengambilan Sampel di Lapang

Pengambilan sampel berupa sedimen berasal dari Pantai Panggungrejo, Kelurahan Bugulkidul, Kota Pasuruan, Jawa Timur. Sampel sedimen yang diperoleh langsung segera diberi perlakuan pada suhu 4 °C hingga dilakukan uji lanjut. Adapun peta lokasi dari pengambilan sampel dapat dilihat pada Lampiran 2.

B. Persiapan Sampel

Dalam persiapan sampel, dilakukan pengambilan sampel berupa sedimen pasir Pantai Panggungrejo, Pasuruan, Jawa Timur. Diambil sedimen pasir pantai menggunakan sendok. Setelah itu, sampel sedimen dimasukkan kedalam plastik PP dan diikat. Lalu, sampel dimasukkan kedalam *coolbox* dan diberi es batu untuk memberikan kondisi suhu 4 °C agar bakteri yang ada pada sampel tidak melakukan metabolisme hingga dilakukan proses pengujian lanjutan. Setelah berada di laboratorium, sampel sedimen ditimbang sebanyak 1 g dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah sampel kering dilakukan proses pengenceran dan penanaman.

Seperti yang dilakukan oleh Balan, *et al.* (2012), sampel sedimen yang dikumpulkan dari beberapa pantai yang berbeda diambil menggunakan spatula. Sebagian sampel yang telah dikumpulkan, lalu dipindahkan pada kantong berbahan polietilena untuk dibawa menuju laboratorium. Dan selama perjalanan, sampel disimpan dalam kotak yang berisi es untuk menjaga suhunya 4 °C sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

C. Pembuatan Larutan Na Fisiologi (NaFis) 0,9%

Pembuatan larutan stok NaFis 0,9% dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Setelah itu ditimbang NaCl sebanyak 9 g dengan bantuan timbangan digital. Setelah itu NaCl dicampurkan kedalam 1 L akuades menggunakan erlenmeyer 1000 mL. selanjutnya diambil larutan NaFis sebanyak 9

mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang akan digunakan dalam tahapan pengenceran. Banyaknya tabung reaksi yang dibutuhkan bergantung dari banyaknya proses pengenceran yang akan dilakukan, dan pada penelitian ini akan dilakukan pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-5} . Sedangkan sisa larutan NaFis yang tidak digunakan akan disimpan sebagai larutan stok.

D. Pembuatan Media LBA (Luria Bertani Broth)

Pembuatan media LBA (Luria Bertani Broth) berdasarkan pada Miller (2015), dengan melakukan beberapa modifikasi, yaitu dengan perbandingan yeast ekstrak sebanyak 5 g, sodium klorida atau NaCl sebanyak 1 g, pepton sebanyak 10 g dan agar sebanyak 15 g yang dilarutkan dalam 1000 mL akuades. Berdasarkan perbandingan tersebut, lalu dibuat media LBA sebanyak 120 mL didalam erlenmeyer. Setelah itu, erlenmeyer yang berisi media ditutup dengan *aluminium foil* dan dipanaskan diatas *hotplate* agar media lebih cepat tercampur rata. Kemudian media disterilisasi pada suhu 121°C , tekanan 1 atm, selama 15 menit. Setelah selesai, media langsung ditambahkan anti jamur sebanyak 0,006 g dan dituang kedalam cawan petri kira-kira sebanyak 20 mL. Proses penuangan media harus dilakukan didalam laminaran *air flow* dan didekat bunsen untuk menghindari terkontaminasi bakteri.

E. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi adalah suatu proses untuk membunuh atau menghilangkan segala bentuk kehidupan. Salah satu proses sterilisasi alat yang sering dilakukan adalah menggunakan autoklaf yang didalamnya nanti akan berisi uap panas dengan tekanan yang tinggi. Lamanya proses sterilisasi bergantung dari jenis bahan dan ukuran alat yang akan disterilisasi. Dan kondisi optimal untuk peralatan laboratorium adalah pada suhu 121°C , tekanan 15 psi atau 1 atm selama 15 menit. Uap air yang ada dalam autoklaf harus dapat menembus setiap alat yang disterilisasikan, sehingga isi dari autoklaf tidak boleh terlalu penuh agar

penggunaan autoklaf dalam proses sterilisasi dapat berlangsung efektif (Adji, *et al.*, 2007). Adapun alat dan bahan yang perlu dilakukan sterilisasi antara lain pipet serologis, pipet volume, cawan petri, tabung reaksi (berisi NaFis 0,9%), erlenmeyer (berisi media LBA).

F. Pengenceran dan Penanaman Sampel pada Media LBA

Proses pengenceran diawali dengan menyiapkan tabung reaksi yang masing-masing sudah berisi 0,9 mL NaFis 0,9% sebanyak 5 buah dan sudah disterilisasi. Setiap tabung diberi label berurutan sebagai berikut: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Selanjutnya diambil sampel sedimen yang sebelumnya telah dikeringkan terlebih dahulu sebanyak 1 g dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berlabel 10^{-1} . Setelah itu, pilin tabung hingga sampel tercampur rata dan dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} .

Langkah selanjutnya adalah dilakukan penanaman sampel dengan cara mengambil 1 ml larutan dari hasil pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} dan dimasukkan kedalam cawan petri yang telah berisi media LBA dengan metode tebar. Setelah itu, cawan petri diberi label sesuai pengenceran dan dibungkus dengan *plastic wrap*. Kemudian cawan petri tersebut diinkubasi selama 24 jam didalam inkubator yang bersuhu 37°C .

Menurut Dwidjoseputro (1998), sampel yang telah diambil dari suatu suspense yang didalamnya terdapat bermacam-macam spesies bakteri diencerkan dalam sebuah tabung tersendiri. Dari pengenceran pertama tersebut diambil sebanyak 1 mL untuk dilakukan pengenceran lagi. Bila perlu dilakukan pengenceran lagi hingga pada pengenceran ketiga dapat diambil sebanyak 0,1 untuk dilakukan penanaman. Hasil penanaman dari pengenceran ketiga biasanya akan mendapatkan beberapa koloni atau bahkan hanya terdapat 1 koloni saja yang tumbuh.

G. Isolasi Bakteri Murni dan Pembuatan Stok Kultur Murni

Tahapan berikutnya adalah melakukan isolasi bakteri murni yang dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri yang tumbuh pada cawan petri lalu diisolasi dengan cara metode gores T kuadran. Koloni bakteri yang tumbuh terpisah diambil menggunakan jarum loop dan digoreskan kedalam media LBA baru secara zig-zag membentuk T kuadran. Kemudian media tersebut diinkubasi lagi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Selanjutnya, diambil koloni bakteri yang berasal dari goresan terakhir dan dipindahkan pada media miring LBA untuk dijadikan stok kultur murni. Proses pemindahan bakteri dilakukan dengan menggunakan jarum loop dan digoreskan pada media miring secara zig-zag. Lalu media miring tersebut, diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Menurut Irfan (2014), isolasi bakteri murni dapat dilakukan dengan menggunakan metode gores secara kesinambungan. Koloni bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose. Kemudian koloni bakteri digoreskan pada media agar hingga setengah cawan. Setelah itu cawan petri diputar hingga 90°, lalu digoreskan kembali pada permukaan media agar yang tersisa. Menurut Dwidjoseputro (1998), biasanya bakteri yang dapat mengencerkan gelatin pada media uji gelatin akan memiliki koloni yang berbentuk seperti kawah, seperti mangkuk atau seperti pundi-pundi yang berlapis.

H. Skrining Bakteri Penghasil Gelatinase

Skrining gelatinase pada bakteri murni dilakukan berdasarkan metode Cruz, *et al.* (2012) dengan beberapa modifikasi, yaitu dengan cara membuat media uji gelatin terlebih dahulu dengan komposisi sebanyak 5 g pepton, 120 g gelatin, dan 3 g *beef* ekstrak dalam 1 L akuades. Berdasarkan pada komposisi tersebut maka dapat dibuat media uji gelatin sesuai banyaknya bakteri murni yang akan

dilakukan pengujian. Semua bahan tersebut dicampurkan dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas *hot plate* untuk mempercepat proses penghomogenan larutan. Kemudian media gelatin dimasukkan kedalam tabung reaksi kurang lebih sebanyak 10 mL setiap tabungnya, lalu ditutup dengan kapas dan kertas aluminium. Selanjutnya media uji gelatin disterilisasi pada suhu 121 °C, selama 15 menit pada tekanan 1 atm.

Setelah dilakukan proses sterilisasi, media dibiarkan dingin dan dimasukkan bakteri murni kedalam media. Proses pemindahan bakteri dari media miring menuju media gelatin menggunakan jarum ose dan dimasukkan hingga setengah bagian dari media gelatin. Proses tersebut harus dilakukan didalam laminaran *air flow* dan didekat api bunsen untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Setelah itu, media gelatin diinkubasi selama 3 hingga 7 hari pada suhu ruangan dan disetiap 24 jam sekali selalu dilakukan pengecekan bakteri yang tumbuh berpotensi sebagai penghasil gelatinase atau tidak. Proses pengecekan dilakukan dengan memasukan media uji gelatin kedalam lemari pendingin (kulkas) selama 30 menit dan diamati perubahannya. Apabila setelah 30 menit media gelatin berubah menjadi beku maka bakteri yang terkandung dalam media tersebut tidak menghasilkan enzim gelatinase. Dan apabila media tetap dalam keadaan cair, maka bakteri yang tumbuh positif menghasilkan enzim gelatinase.

3.4.2 Penelitian Utama (Tahap II)

Adapun pada penelitian utama yang dilakukan pada Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Genetik dan Mikrobiologi Fakultas Sains Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang terdapat beberapa tahapan sebagai berikut :

A. Analisa Spesies Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase Menggunakan Sekuensing 16S rNA

• Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan prosedur dari Kit Isolasi DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit from Promega) dengan langkah berikut; diambil 0,5 g sampel, masukkan dalam tube 2 mL yang berisi 1,5 mL *buffer cell lysis solution* dan di *mix* (sampai tercampur). Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit kemudian *centrifuge* 2,000 x *g* selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan tetap memperhatikan pelet agar tidak ikut terbang, pelet ditambahkan 1 mL *nuclei lysis* dan di vortek. Lalu ditambahkan 0,3 mL *protein preipitation solution*, kemudian di vortek selama 20 detik, *centrifuge* 2,000 x *g* selama 10 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan *tube* 1,5 mL baru yang berisi 1 mL isopropanol kemudian di vortex dan dilakukan *centrifuge* 2,000 x *g* selama 1 menit. Supernatant di buang (pelet tidak boleh terbang), ditambahkan 1 mL ethanol 70% dan dilakukan *centrifuge* 2,000 x *g* selama 1 menit. Supernatant di buang, dan pelet dikeringkan dengan vakum untuk memastikan ethanol benar-benar hilang. Hasil pelet dilarutkan dengan menambahkan 75 μ L *DNA rehydration solution*, diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam, selanjutnya disimpan pada suhu -20° C hingga digunakan.

• Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA yang telah diisolasi menggunakan mesin UV spektrofotometer *Biorad*. Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan mengambil sampel DNA sebanyak 5 μ L kemudian ditambah dengan 995 μ L Tris-EDTA (TE) *buffer* dan diletakkan pada alat vorteks hingga larutan homogen. Selanjutnya larutan dimasukkan dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Sebelum dilakukan absorbansi dilakukan pada larutan tersebut, dilakukan peneraan dengan menggunakan TE buffer sebagai larutan blanko. Penentuan tingkat kemurnian DNA dilakukan dengan rumus berikut ini.

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{A_{230}}{A_{260}} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Menurut Fatchiyah, *et al.* (2011), kemurnian DNA pada perbandingan $\frac{A_{230}}{A_{260}}$ pada kisaran nilai <0,5. DNA yang memiliki kisaran nilai kemurnian >0,5 menunjukkan keberadaan kontaminasi polisakarida. Perhitungan kemurnian DNA pada perbandingan $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ memiliki kisaran nilai 1,8-2. DNA yang memiliki kisaran nilai kemurnian >2 menunjukkan bahwa terjadi kontaminasi protein sedang kisaran nilai <1,8 menunjukkan keberadaan kontaminasi RNA. Penghitungan konsentrasi DNA dilakukan dengan rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} = nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

50 = larutan dengan nilai absorbansi 1,0 yang sebanding dengan 50 μ g untai ganda DNA per mL

- **Perancangan Primer**

Primer didesain berdasarkan pada gen (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') dengan lokus spesifik gen (5'-TACGGCTACCTTGTTACGA-3') yang terdapat pada NCBI *database* (*National Center for Biotechnology Information*). Primer didesain menggunakan *software* Oligo Analyzer versi 1.0.2., Oligo Explorer 1.1.0. dan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dapat diakses secara online pada NCBI. Primer yang telah dirancang diuji dengan *software* Oligo Analyzer versi 1.0.2. meliputi kandungan % GC content, T_m (*time melting*), uji *hairpin* atau *loop*, uji *dimmer*

dan uji *multiplex* antara primer *forward* dan primer *reverse*.

- **Amplifikasi Gen dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Amplifikasi genotyping gen dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* atau PCR dengan menggunakan mesin *thermocycler*. Komposisi PCR dengan volume total 20 $\mu\text{L}/\text{tube}$ terdiri atas 6 μL ddH₂O, 10 μL PCR kit GoTaq® Green Master Mix (10 x buffer taq polymerase, dNTP, MgCl₂, primer, Taq DNA polymerase, ddH₂O), primer *forward* 1 μL , primer *reverse* 1 μL dan 2 μL DNA sampel hasil isolasi. Penentuan suhu amplifikasi mengacu pada Correa (2012), secara berurutan proses amplifikasi dikondisikan pada suhu pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit 1 kali siklus dan denaturasi dengan 30 kali siklus pada suhu 95 °C 30 detik, (33 °C; 31,5 °C dan 30 °C) selama 30 detik, dan 72 °C selama 30 detik, dilanjutkan dengan 1 siklus ekstensi pada suhu 72 °C selama 10 menit dan suhu 4 °C selama 5 menit.

- **Konfirmasi Hasil Amplifikasi Gen**

Hasil PCR semua sampel DNA yang telah diamplifikasi dikonfirmasi dengan menggunakan elektroforesis horizontal gel agarosa 1,5%. Gel agarosa 1,5% dilakukan dengan cara berikut, bubuk agarosa ditimbang sebanyak 0,6 g kemudian dilarutkan di dalam 40 mL TBE *buffer* dan dipanaskan hingga terbentuk larutan yang transparan (bening). Larutan agarosa didiamkan hingga hangat kemudian dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis yang telah ditambah dengan 0,5 μL etidium bromida. Sisir dipasang pada ujung bak elektroforesis dan didiamkan hingga larutan agarosa mengeras (gel). Sisir diambil pada gel agarosa yang telah terbentuk kemudian dipindahkan pada bak elektroforesis ditambah dengan TBE *buffer* hingga seluruh permukaan gel tertutup larutan *buffer*. Sebanyak 2 μL sampel DNA dicampur dengan 1 μL *loading dye* dicampur kemudian dimasukkan ke dalam sumuran secara

perlahan. Selanjutnya, dilakukan proses elektroforesis (*running*) dengan tegangan 65 Volt selama 1,5 jam. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan menggunakan UV transiluminator dan didokumentasikan dengan kamera polaroid.

- **Purifikasi Amplikon Gen**

Sampel amplikon hasil PCR gen yang sebagian telah digunakan untuk konfirmasi elektroforesis dimasukkan dalam *tube* dengan volume maksimum 1,5 mL. Sampel tersebut ditambah dengan sodium asetat (*Merck*) sebanyak 0,1 % dari total volume sampel amplikon dalam *tube* yang akan dipurifikasi. Berikutnya ditambahkan ethanol absolut dingin sebanyak dua kali volume larutan sodium asetat dan sampel amplikon. Kemudian dilakukan *spin down* dengan menggunakan alat sentrifugasi dan disimpan pada suhu -20°C selama 60 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 200 μL etanol 70% dingin dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Pelet hasil sentrifugasi ini kemudian dikeringkan dengan menggunakan inkubator pada suhu 37°C . Pelet yang telah kering ditambah dengan ddH₂O sebanyak 15 μL .

- **Sequencing (Pengurutan Sekuen) DNA Amplikon Gen**

Sequencing atau pengurutan sekuen DNA dilakukan untuk mengetahui sekuen DNA yang mengalami *polimorfisme*. *Sequencing* dilakukan dengan menggunakan sampel DNA dari hasil PCR yang telah di purifikasi. Pada konfirmasi amplifikasi DNA dengan elektroforesis gel agarosa, pita yang paling tebal dipilih sebagai sampel untuk *sequencing*. Pita yang paling tebal dipilih dengan asumsi bahwa DNA telah dikenali oleh primer yang spesifik dan teramplifikasi dengan panjang sekuen yang sesuai. Komposisi *sequencing*

terdiri dari amplicon gen sampel yang telah dipurifikasi 2 μL , ddH₂O 10 μL , Big Dye terminator 8 μL (menggunakan *ABI PRISM[®] BigDye[®] terminator v3.1 cycle sequencing kits*), larutan penyangga 5 μL (*buffer* dengan EDTA (*Applied Biosystem*)), dan primer dengan konsentrasi 20 pmol sebanyak 2 μL sehingga jumlah keseluruhan 25 μL . Selanjutnya dilakukan *PCR* sekuensing dengan optimasi suhu sesuai petunjuk reagen kit sekuensing, sampel hasil *PCR* sekuensing dilakukan purifikasi ulang sebelum dilanjutkan ke mesin sekuensing, hasil purifikasi berupa amplicon kedua ini ditambah dengan larutan buffer khusus yaitu *Hi-DiTM Formamide* (*Genetic Analysis Grade-Applied Biosystem*) dan disekuensing menggunakan *ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer* di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

B. Penggabungan Hasil Sekuensing *Forward* dan *Reverse*

Proses penggabungan hasil sekuensing *forward* dan *reverse* dapat dilakukan dengan bantuan *software* yang bernama Bioedit. Langkah penggabungan hasil sekuen dimulai dengan membuka menu "*New Alignment*". Setelah itu dipilih menu "*File*", lalu pilih "*Import*" dan di klik "*Sequence alignment file*". Kemudian dipilih kedua *file* sekuen yang akan digabungkan dan disimpan dalam bentuk format Fasta dengan menggunakan nama baru. Setelah selesai, dipilih sekuen *reverse* untuk dilakukan proses pembalikan hasil sekuen *reverse* dengan cara pilih menu "*Sequence*", lalu pilih "*Nucleid Acid*" dan diklik "*Reverse Complement*". Selanjutnya dilakukan penggabungan kedua hasil sekuens melalui menu "*Sequence*", lalu pilih "*Pairwise alignment*", dan diklik "*Align two sequence allow end to slide*". Untuk menampilkan hasil penggabungan kedua sekuen dapat dilakukan dengan cara memilih menu "*Alignment*" dan diklik "*Create consensus sequence*". Langkah terakhir adalah dipilih hasil penggabungan

sekuen, lalu dipilih menu “*Edit*” dan diklik “*Copy Sequence to Clipboard*” sehingga file dapat disimpan dalam lembar kerja baru dan disimpan kedalam format Fasta (Rukmana, 2015).

Menurut Suyono (2010) format Fasta merupakan salah satu jenis format berbasis teks yang digunakan untuk menyimpan hasil sekuen nukleotida atau sekuen protein, dimana didalamnya terdapat informasi mengenai pengkodean dari pasangan basa atau asam amino yang diwakilkan dengan menggunakan huruf tunggal. Dan mengenai nama dan penjelasan dari hasil sekuen selalu berada diawal baris dengan diawali dengan simbol “>”.

C. Pencarian *Database Spesies* dengan Gen Bank

Hasil penggabungan kedua sekuen isolat dapat dilakukan perbandingan *database* nukleotida melalui situs *online* www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) tipe BLAST. Data yang digunakan sebagai *input* adalah hasil penggabungan sekuen 16S rDNA dari kedua isolat. Dan hasil *output* dari program ini berupa tampilan sekuen yang memiliki kemiripan tertinggi terhadap *database*. Untuk melihat hasil spesies isolat dapat melihat nilai *query sequence* yang diperoleh dari perbandingan dengan *database* GenBank. Hasil isolat dapat dikatakan sebagai spesies baru apabila tingkat kesamaan urutan basa gen dengan GenBank kurang dari 97%. Dan data hasil BLASTn dapat dikatakan *reliable* bila nilai *bits score* diatas 50. Selain itu hasil perbandingan kesamaan sekuen juga harus memiliki nilai identitas minimal 25% dengan nilai *E-value* sebesar 0,0 agar dapat dikatakan bahwa kedua jenis sekuen yang dibandingkan memiliki struktur dan *folding* yang mirip (Suyono, 2010).

D. Pembuatan Pohon Filogenik Sekuen DNA

Menurut Sukartiningrum (2012), dalam pembuatan pohon filogenik dapat dilakukan dengan menggunakan program BLAST pada situs

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, program ClustalW dan program MEGA5. Adapun tahapan pembuatan pohon filogenik sebagai berikut:

- 1) Membandingkan hasil sekuens bakteri isolat dengan bakteri lain yang ada di GenBank dengan cara sebagai berikut:
 - Membuka program Blast pada situs web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
 - Klik pada pilihan *nucleotide blast*
 - Memasukkan data hasil sekuen isolat pada kolom *upload file*, lalu pada menu "*Database*" diklik pilihan "*Others*".
 - Setelah itu klik Blast dan dipilih beberapa data sekuen bakteri yang diperlukan dengan cara memilih pilihan "*get selected sequences*".
 - Kemudian klik "*Send to*", lalu dipilih "*File*" dan dipilih format Fasta baru diklik ok.

- 2) Sebelum membuat desain pohon filogenik, perlu dilakukan perubahan format Fasta sekuen bakteri menjadi format MEGA. Proses perubahan format *file* tersebut dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:
 - Diklik kanan pada file hasil Blast yang masih dalam format Fasta dan dipilih "*open with MEGA5*".
 - Kemudian pada tampilan layar M5: *Alignment Explorer* dipilih menu "*Alignmnet*" lalu dipilih "*Align by Clustal W*" dan diklik ok.
 - Setelah proses selesai, dipilih menu "Data", lalu "*Export alignment*" dan diklik MEGA format.

- 3) Membuat desain pohon filogenik dengan menggunakan aplikasi MEGA5, langkah-langkah yang harus dilakukan sebagai berikut:
 - Membuka aplikasi MEGA5, lalu pada *toolbar* dipilih menu "*Phylogeny*", lalu diklik "*Construct/Test Neighbor-Joining Tree*".
 - Memilih *file* sekuen yang telah dirubah dalam bentuk format MEGA dan

dipilih "*open computer*".

- Setelah gambar desain filogenik muncul, lalu klik "*Image*" dan simpan gambar pohon filogenik tersebut.

E. Pewarnaan Gram Pada Bakteri Penghasil Gelatinase

Pada pewarnaan gram bakteri yang menghasilkan enzim gelatinase dilakukan dengan cara mengambil sedikit akuades untuk ditetaskan pada kaca objek dan ditambahkan 1 ose biakan sampel, lalu difiksasi di atas api. Lalu sampel ditetaskan pewarnaan kristal violet dan biarkan selama 1 menit. Setelah itu, dibilas dengan air mengalir, lalu ditetaskan lugol hingga menutupi sampel dan dibiarkan selama satu menit, baru kemudian dibilas lagi dengan air mengalir. Kemudian sampel ditetaskan alkohol 70% dan dibiarkan kembali selama 10-20 detik. Selanjutnya sampel dibilas dengan air mengalir lagi dan ditetaskan safranin hingga menutupi permukaan sampel dan dibiarkan selama 20-30 detik lalu dibilas lagi dengan air mengalir. Selanjutnya, sampel dikeringkan menggunakan kertas serap atau tisu dan ditambahkan minyak emersi. Setelah itu, sampel dapat diamati di bawah mikroskop untuk melihat hasil pewarnaan gram. Bakteri dapat dikatakan sebagai gram negatif jika berwarna merah, sedangkan jika bakteri berwarna ungu bakteri tersebut termasuk jenis gram positif (Fitri dan Yekki, 2011).