

III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Karantina Tumbuhan Balai Besar Karantina Pertanian (BBKP) Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Oktober 2017.

3.2. Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah autoklaf, *Laminar air flow cabinet* (L AFC), mikroskop, kamera canon EOS 400D, shaker, vortex, spektrofotometer, pH meter, cawan petri diameter 9 cm, bunsen, mortar, jarum ose, stik L, jarum inokulasi, beaker glass, tabung reaksi, mikropipet, timbangan analitik, inkubator, PCR unit, Elektroforesis unit.

Bahan yang digunakan adalah tananam padi yang terserang busuk biji sebagai sampel penelitian, tanaman tembakau, akuades, media nutrient agar (NA), media nutrient broth (NB), media *Sucrose Phospat Glutamate* (S-PG), media King's B (KB), media *Yeast extract-Dextrose-Calcium Carbonate* (YDC), *Nutrient-broth yeast extract agar* (NBY), Media Arginine broth, Media D1M agar, *Soluble potato starch*, gelatin, media basal (anaerob), HCl 1%, NaOH 10%, NaCl 3%, KOH 3%, kertas saring diameter 5 mm.

3.3. Metode penelitian

Penelitian terdiri dari 3 tahapan, yaitu :

1. Isolasi bakteri : (a) pengambilan sampel (b) isolasi bakteri di media selektif (c) uji hipersensitif dan patogenisitas.
2. Karakterisasi bakteri : (a) pengujian Gram (b) inokulasi bakteri pada kondisi anaerob (c) pengujian pigmen fluorescens (d) inokulasi bakteri pada media YDC (e) inokulasi bakteri pada D1M agar (f) pengujian oksidasi (g) pertumbuhan bakteri pada suhu 40°C (h) pertumbuhan bakteri pada pH yang berbeda (i) pertumbuhan pada kadar NaCl 3% (j) arginine dihidrolase (k) hidrolisis gelatin (l) hidrolisis pati (m) Pengujian *Triple Sugar Iron* (TSI).
3. Identifikasi molekuler : (a) ekstraksi DNA (b) amplifikasi DNA (c) elektroforesis.

3.4. Pelaksanaan penelitian

3.4.1. Pengambilan sampel

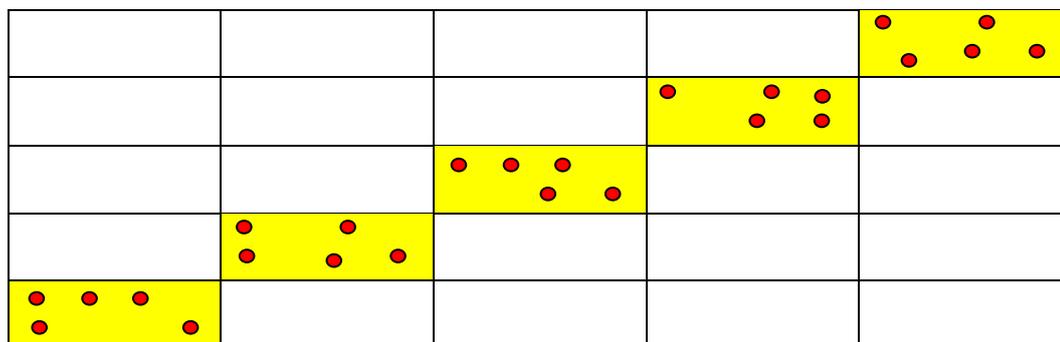
Sampel padi yang diambil pada fase generatif, yaitu saat gabah masak susu. Bagian tanaman padi yang diambil adalah bagian pangkal malai hingga ujung malai. Pengambilan sampel dilakukan pada beberapa kecamatan di Malang Raya yang telah dipilih secara acak dengan cara pengundian yaitu pada kecamatan Tumpang (TMP), Jabung (JBG), Bululawang (BLG), Kepanjen (KPJ), Gondanglegi (GDL), Poncokusumo (PCK), Dampit (DMP), Pakis (PKS), Wajak (WJK), Sukun (SKN), Dau (DAU), Singosari (SGS), Lawang (LWG), Kasembon (KSB), Karangploso (KRP), Junrejo (PDM), Pakisaji (PKA), dan Turen (TRN). Gejala yang diambil untuk dijadikan sampel berupa busuk pada biji, terdapat becak hitam pada pangkal biji disertai biji kosong dan mengering.



Gambar 3. Peta wilayah Malang Raya (Pemerintah Kabupaten Malang, 2016)

Titik pengambilan sampel pada setiap kecamatan ditentukan secara acak. Pengambilan sampel merujuk pada (Delp *et al.*, 1986; Campbell dan Madden, 1990) yang telah dimodifikasi setiap titik pengambilan sampel diambil 5 petak sawah secara diagonal, dan setiap petak sawah diambil 5 sampel tanaman

secara acak, ditunjukkan pada (Gambar 4) Sampel yang telah diambil dimasukkan ke dalam amplop coklat dan dijadikan sampel komposit.



Gambar 4. Plot pengambilan sampel gabah padi (Delp *et al.*, 1986)

Keterangan : Petak sawah, sampel gabah padi

3.4.2. Isolasi bakteri

Isolasi mengacu pada Schaad *et al.* (2001). Sampel di timbang sebanyak 10 g kemudian di haluskan menggunakan mortar dan pestel. Sampel yang telah halus di ambil 1 g dan dimasukkan ke dalam tube 50 ml, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 40 ml. Sampel di *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 2 jam. Isolasi bakteri dilakukan dengan cara penggoresan, suspensi diambil dengan jarum ose, kemudian di goreskan pada media *Sucrose Phospat Glutamate* (S-PG) dan diamati hingga 7 hari.

Komposisi media semi selektif S-PG dalam 1 liter membutuhkan KH_2PO_4 1,3 g, Na_2HPO_4 1,2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4+2\text{H}_2\text{O}$ 24 mg, EDTA-Fe 10 mg, D-sorbitol 10 g, Methyl violet 1 mg, Phenol red 20 mg, dan agar 15 g. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilkan tambahkan 1 ml larutan stok yang telah disterilisasikan menggunakan saringan. Larutan stok yang ditambahkan adalah L-cystine (1 mg/100 ml stok), Pheneticillin, potassium salt (5 g/100 ml stok), Ampicillin, sodium salt (1 g/100 ml stok), Ceftrimide (1 g/100 ml stok).

3.4.3. Uji hipersensitif dan patogenisitas

1. Uji hipersensitif

Metode untuk uji hipersensitif mengacu pada Schaad *et al.* (2001), Bakteri ditumbuhkan pada media King's B dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri dipanen dengan jarum ose dan di suspensikan ke dalam akuades steril kemudian dihitung *Optical Density* (OD) sama dengan 1 (sekitar 10^7 sampai 10^8 CFU / ml). Suspensi bakteri kemudian diinokulasi ke bagian daun tembakau menggunakan

jarum inokulasi. Perlakuan kontrol menggunakan akuades steril. Reaksi hipersensitif yaitu daun tembakau mengalami nekrosis pada 1-4 hari setelah inokulasi. Varietas tembakau menggunakan TN90.

2. Uji patogenisitas

Metode uji patogenisitas mengacu pada metode yang di gunakan oleh (Nandakumar *et al.*, 2009). Strain diuji untuk patogenisitas pada padi varietas IR64 dengan inokulasi pada stadium bibit. Inokulum ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* yang diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam, kemudian diukur *Optical Density* (OD) hingga kerapatan sama dengan 1 (sekitar 10^7 sampai 10^8 CFU/ml). Bibit IR64 yang akan diinokulasi sudah memiliki 3-4 daun. Teknik inokulasi dengan menyuntikkan pada pelepah daun ketiga dengan 0,5 ml suspensi bakteri menggunakan jarum suntik steril 1 ml. Air akuades steril disuntikkan ke pelepah bibit tanaman kontrol. Skala dan gejala diukur berdasarkan laporan (Nandakumar *et al.*, 2009).

Tabel 3. Skala dan gejala penyakit busuk biji pada tahap vegetatif

Skala	Gejala
-	Tidak terdapat gejala setelah inokulasi
+	Sedikit berwarna kecoklatan di sekitar tempat suntikan
++	Terbentuk luka berwarna abu-abu yang berbeda berdiameter 1-2 cm, menyebar ke atas dan ke bawah dari tempat suntikan dengan tepi coklat gelap
+++	Luka menyebar di batang dari tempat suntikan ke dalam daun pisau (<i>leaf blade</i>) menjadi berwarna kuning dan nekrotik

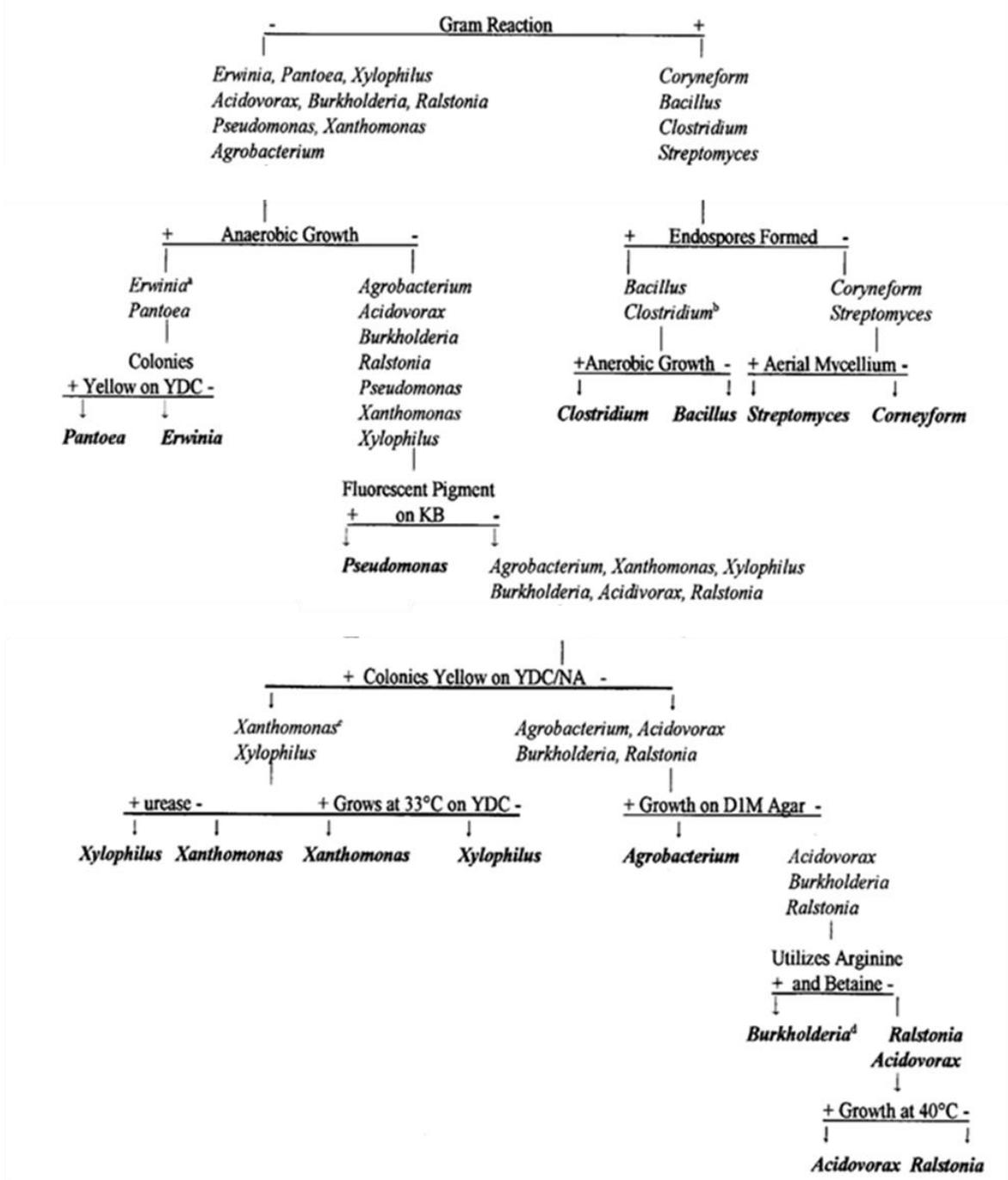
3.4.4. Karakterisasi bakteri penyebab busuk biji

1. Karakterisasi morfologi

Sifat morfologi yang diamati meliputi morfologi koloni pada media King's B agar dan morfologi sel bakteri dari pewarnaan Gram.

2. Karakterisasi fisiologi dan biokimia

Pengujian isolat bakteri secara biokimia dan fisiologi mengacu pada Schaad *et al.* (2001) yang ditunjukkan pada (Gambar 5 dan Tabel 4).



Gambar 5. Pengujian bakteri hingga tingkat genus (Schaad *et al.*, 2001)

Tabel 4. Karakteristik yang akan di uji pada isolat bakteri penyebab penyakit busuk biji di Malang Raya

Karakteristik	<i>B. glumae</i>
Uji oksidase	ND
Pertumbuhan di pH 4	-
Pertumbuhan di pH 8	V
Pertumbuhan di pH 9	-
Pertumbuhan di suhu 40°C	+
Pertumbuhan di NaCl 3%	+
Dihidrolisis arginine	+
Pencairan gelatin	+
Hidrolisis pati	-
Pemanfaatan sumber karbon:	
Laktosa	-
Sukrosa	-

+, 80% atau lebih strain positif; V, antara 21-79% strain positif; -, 80% atau lebih strain negatif; ND, tidak ditentukan. (Schaad *et al.*, 2001)

a. Uji Gram

- KOH

Pengujian dilakukan dengan mencampurkan satu ose isolat bakteri pada preparat steril yang telah ditetesi KOH 3% menggunakan jarum ose. Apabila suspensi ditarik ke atas terdapat lendir maka bakteri tersebut termasuk Gram negatif Apabila suspensi ditarik ke atas tidak terdapat lendir maka bakteri tersebut termasuk bakteri Gram positif.

- Pewarnaan Gram

Satu ose bakteri digoreskan di atas preparat steril lalu ditambah akuades steril lalu diratakan, fiksasi bakteri dilakukan dengan melewati bagian bawah preparat di atas bunsen hingga semua permukaan preparat kering. Kemudian ditetesi 1 tetes larutan kristal violet diamkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 2 detik, lalu dikeringanginkan. Setelah itu, preparat ditetesi 1 tetes larutan iodine diamkan selama 1 menit. Preparat kemudian dicuci dengan air mengalir selama 2 detik, lalu dikeringanginkan. Pewarnaan kembali dengan ditetesi 1 tetes etil alkohol selama 30 detik. Preparat lalu dicuci dengan air mengalir kurang lebih 2 detik, kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya preparat ditetesi 1 tetes larutan safranin dan diratakan di atas preparat selama 10 detik. Terakhir, cuci preparat dengan air mengalir kemudian dikeringanginkan. Amati warna pada kaca preparat dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 100 kali. Bakteri Gram negatif mempunyai sel warna merah, sedangkan bakteri Gram positif mempunyai sel warna ungu.

b. Tes oksidatif-fermentatif

Bakteri Gram negatif kemudian diuji pertumbuhannya secara anaerob dengan menginokulasikan bakteri dalam media basal sebanyak 5 ml. Media basal dalam 1 liter akuades terdiri dari pepton 2 g, NaCl 5 g, KH_2PO_4 0,3 g, Agar 3 g, dan bromothymol blue (larutan 1%) 3 ml. Bahan-bahan dihomogenkan dalam akuades dan diatur pada pH 7 kemudian disterilkan pada suhu 12°C selama 20 menit. Setelah itu tambahkan larutan glukosa 10% sebanyak 0,5 ml. Setelah itu, inokulasikan bakteri ke dalam dua tabung reaksi yang berisi media basal lalu satu tabung ditutup parafin cair dan satu tabung lainnya tidak ditambah parafin, Perubahan warna dari biru menjadi kuning di media yang ditutup parafin menunjukkan hasil yang positif, artinya dia mampu tumbuh secara anaerob (fermentatif).

c. Pigmen fluoresen pada media King's B

Pengujian pigmen fluoresen menggunakan media King's B agar. Komposisi media King's B dalam 1 liter akuades membutuhkan Protease peptone 20 g, K_2HPO_4 1,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g, Glycerol 15 ml, dan Agar 15 g. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit, lalu distribusikan pada cawan petri.

Inokulasi isolat bakteri pada media King's B lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 33°C . Amati koloni bakteri di bawah sinar UV pada gelombang 366 nm di ruang terang dan gelap. Apabila berpendar maka ia merupakan genus *Pseudomonas*, jika ia tidak berpendar ia kemungkinan bakteri genus *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Xylophilus*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, atau *Ralstonia*.

d. Koloni kuning pada media YDC

Komposisi untuk membuat media YDC (*Yeast extract-dextrose-CaCO₃*) dalam 1 liter akuades membutuhkan Yeast extract 10 g, Dextrose (glucose) 20 g, Calcium carbonate (CaCO_3) 20 g, dan agar 15g. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 10 PSI selama 1 jam, atau memisahkan dextrose pada 100 ml akuades dan disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Distribusikan pada cawan petri.

Menginokulasikan isolat bakteri pada media YDC dengan metode streak penuh, lalu inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 33°C . Jika koloni yang tumbuh

berwarna kuning ia kemungkinan bakteri genus *Xanthomonas* atau *Xylophilus*, jika ia tidak berwarna kuning ia kemungkinan bakteri genus *Agrobacterium*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, atau *Ralstonia*.

e. Pertumbuhan pada media D1M agar

Komposisi untuk membuat media D1M agar dalam 1 liter akuades membutuhkan Cellobiose 5 g, NH_4Cl 1g, NaH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$ 3 g, Malachite green 10 mg, dan agar 15 g. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Distribusikan pada cawan petri, lalu distribusikan pada cawan petri.

Menginokulasikan isolat bakteri pada media D1M agar dengan metode streak penuh, lalu inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 33°C . Jika tumbuh koloni ia kemungkinan bakteri genus *Agrobacterium*, jika ia tidak tumbuh ia kemungkinan bakteri genus *Acidovorax*, *Burkholderia*, atau *Ralstonia*.

f. Uji Oksidase

Isolat bakteri ditumbuhkan dimedia NA, lalu diinkubasi selama 24 jam. Pindahkan biakan bakteri dengan jarum ose atau tusuk gigi ke kertas saring, yang telah diresapi dengan 1% *tetramethyl-p-phenylenediamine dihidroklorida*. Jika hasil positif maka isolat bakteri akan berubah menjadi berwarna ungu dalam waktu 10 detik.

g. Pertumbuhan pada 40°C

Pengujian pertumbuhan bakteri pada suhu 40°C menggunakan media NBY (*Nutrient-broth yeast extract agar*) yang mengandung 0,5% dextrose. Komposisi media NBY dalam 1 liter akuades membutuhkan Nutrient broth 8 g, Yeast extract 2g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 0,5 g, Glukosa 2,5 g, dan Agar 15 g. Kemudian tambahkan 0,5% dextrose, lalu disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilkan, tambahkan 1 ml larutan steril 1M $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$, lalu distribusikan pada cawan petri.

Menginokulasikan isolat bakteri pada media NBY, lalu inkubasi pada suhu 40°C . Jika biakan berubah menjadi keruh dalam waktu 5 hari dicatat sebagai positif.

h. Pertumbuhan pada pH yang berbeda

Pengujian pH untuk pertumbuhan bakteri pada pH 4, 8, dan 9. Medium pertumbuhan yang sesuai yaitu media *Nutrient-broth yeast extract agar* (NBY). Mengatur pH media NBY dengan menambahkan larutan asam 1 N HCl untuk

mendapatkan pH 4 (sebelum di autoklaf). Mengatur media NBY pH basa (pH 8 dan 9) dengan menambahkan larutan 1 N NaOH (setelah autoklaf). Menginokulasikan isolat bakteri pada media NBY yang telah diatur pH menggunakan metode streak kemudian inkubasi pada suhu 33°C dan mengamati pertumbuhan lebih dari 24 jam.

i. Pertumbuhan pada NaCl 3%

Pengujian pertumbuhan bakteri pada NaCl dengan konsentrasi 3% menggunakan media NBY. Menginokulasikan isolat bakteri pada media NBY yang ditambah 3% NaCl menggunakan metode streak penuh. Jika pertumbuhan tidak terjadi pada konsentrasi 3% NaCl, tes diulang dengan berbagai konsentrasi NaCl dari 1%-3%.

j. Arginine dihidrolase

Pengujian arginine dihidrolase menggunakan media yang mengandung L-arginine pada tabung reaksi yang ditutup minyak parafin. Komposisi yang terkandung dalam media tes arginine dihidrolase dalam 1 liter akuades membutuhkan peptone 1 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 0,3 g, agar 3 g, phenol red 0,01 g, dan L-Arginine HCl 10 g. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Distribusikan pada tabung reaksi sebanyak 5 ml.

Pada tabung yang diuji selanjutnya ditusukkan kultur bakteri yang berumur 24 jam dan ditutup oleh parafin. Selanjutnya kultur diinkubasikan pada suhu 27°C selama 3 sampai 7 hari untuk melihat reaksinya. Reaksi yang positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna media menjadi lebih merah pada tabung yang ditutup minyak parafin, sedangkan yang kontrol tetap berwarna jingga.

k. Pencairan gelatin

Pengujian hidrolisis gelatin menggunakan media nutrient broth yang mengandung 12% gelatin. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian distribusikan pada tabung reaksi sebanyak 5 ml. Pada keadaan dibawah suhu 28°C media gelatin akan menjadi lebih keras.

Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan bakteri uji yang berumur 24-48 jam pada medium gelatin dalam tabung reaksi. Perlakuan diinkubasikan dalam suhu ruang selama 2-5 hari, kemudian sebelum dilakukan pengamatan diinkubasikan terlebih dahulu pada suhu 4°C selama 30 menit dalam lemari

pendingin. Medium yang tetap cair menunjukkan reaksi positif yang membuktikan bahwa bakteri dapat menghidrolis gelatin.

l. Hidrolisis pati

Pengujian hidrolisis pati menggunakan media agar pati dan larutan lugol iodine. Komposisi untuk membuat media agar pati dalam 1 liter air distilasi adalah nutrient agar 23 g, *soluble potato starch* 10 g, lalu disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Komposisi larutan lugol iodine dalam 100 ml akuades dibutuhkan iodine 5 g, *potassium iodide* (KI) 10 g, lalu larutkan iodine dan KI dalam 10 ml H₂O. Kemudian tambahkan volume hingga 100 ml menggunakan air distilasi. Untuk penggunaan, larutan lugol iodine, diencerkan hingga 1/5 dengan air distilasi.

Menginokulasikan isolat bakteri pada agar pati dan inkubasi selama 5 hari. Kemudian banjiri cawan petri dengan Lugol Iodine. Jika terdapat zona bening, dan zona tidak berwarna menunjukkan hidrolisis pati.

m. Pemanfaatan sumber karbon

Pengujian pemanfaatan karbon menggunakan media *Triple Sugar Iron* (TSI). Komposisi media TSI yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa dengan perbandingan 1:10:10, terdapat juga indikator fenol red, serta FeSO₄ untuk memperlihatkan pembentukan H₂S yang ditunjukkan dengan adanya endapan hitam. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit, lalu distribusikan pada tabung reaksi sebanyak 5 ml dan disimpan pada posisi *slant* (miring). Pengujian pemanfaatan sumber karbon menggunakan sumber karbon yaitu sukrosa dan laktosa yang terkandung dalam media TSI

Menginokulasikan isolat bakteri pada media TSI dengan metode tusuk-gores dan amati pertumbuhan lebih dari 2 hari. Bandingkan dengan perlakuan kontrol. Jika media miring dan bawah tabung tidak berubah, maka tidak terjadi pemanfaatan sumber karbon. Jika terjadi pemanfaatan laktosa (atau sukrosa), sejumlah besar asam dihasilkan, yang mengubah indikator Phenol red berwarna kuning baik pada bawah tabung maupun pada media yang miring. Jika media bawah tabung berubah menjadi hitam bakteri tersebut memproduksi H₂S.

3.3.5 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

a. Ekstraksi DNA

Tahap ekstraksi DNA menumbuhkan isolat bakteri pada media King's B. Menginokulasikan isolat bakteri pada media King's B inkubasi pada suhu 33°C

selama 24-48 jam. Masukkan biakan ke tube 2 ml sebanyak 1 ml, lalu setrifuge pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Pindahkan supernatan ke tube 2 ml baru, lalu sentifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit.

Buang supernatan lalu tambahkan PL1 dan RNAse 4 µl lalu inkubasi di *water bath* dengan suhu 65°C selama 10 menit. Tambahkan PL3 sebanyak 75µl dan inkubasi dalam es 5 menit. Sentrifuge 14.000 rpm 2 menit. Pindahkan supernatan di NS Filter (ungu), kemudian sentrifuge 10000 rpm 2 menit. Buang NS Filter, tambahkan 450µl Buffer PC (*pipetting*) Pindahkan larutan ke NS II (hijau) lalu Tambahkan 400µl PW 1 sentrifuge 14.000 rpm 2 menit. Tambahkan PW 2 sebanyak 700µl lalu sentrifuge pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Tambahkan PW2 sebanyak 200µl lalu sentrifuge pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Pindahkan ke collection tube tambahkan Buffer PE diamkan 5 menit, sentrifuge 14000 rpm 2 menit. Simpan di suhu -20°C (*overnight*).

b. Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Tahap PCR dimulai dengan pembuatan Master mix. . Membuat Master Mix mencampurkan Taq DNA 25µl, Primer JIBg Forward (JIBgF) 1 µl, Primer JIBg Reverse (JIBgR) 1 µl, ddH₂O 21 µl, dan DNA template 2 µl kedalam tube 1,5 ml. Master Mix merupakan campuran dari DNA kit Macheryl-Nagel untuk proses amplifikasi DNA. Untuk melakukan kegiatan ini dilakukan di LAFC, siapkan tube 1,5 ml lalu masukan ddH₂O 21 µl. Kemudian masukan Dream taq dengan jumlah 25 µl dan masukan primer *Forward* dan *Reverse* 1 µl. Lalu homogenkan dengan menggunakan Vortex. Masukan *Master Mix* sebanyak 48 µl ke mikrotube steril ukuran 200 µl. Masukan DNA template sebanyak 2 µl ke mikrotube yang telah berisi *Master Mix*. Kemudian homogenkan dengan menggunakan vorteks, lalu masukan ke dalam mesin *Thermocycler Eppendorf* dan pilih DNA yang akan di gandakan yaitu *B. glumae*. Mengatur waktu denaturasi awal selama 3 menit pada 94°C; denaturasi pada siklus selanjutnya selama 30 detik pada 94°C, *Annealing* selama 30 detik pada 58°C, dan Elongasi 30 detik pada 72°C, dan Elongasi akhir selama 10 menit pada 72°C. Rangkaian amplifikasi DNA berulang sebanyak 35 siklus.

c. Teknik Elektroforesis

Tahap elektroforesis dimulai dengan pembuatan gel agarose, dibuat dari campuran agarose 1,5% sebanyak 0,6 g dan larutan buffer TAE IX 40 ml, lalu di panaskan di microwave. Tuangkan gel agarose pada cetakan, tunggu hingga padat dan masukan kedalam elektroforesis unit. Mengambil kertas parafilm

secukupnya, lalu ambil 2 μ l *gel red* dan 2 μ l *loading dye* tuangkan pada kertas parafilm namun dipisahkan terlebih dahulu. Mengambil sampel sebanyak 10 μ l dan pipeting dengan *gel red* dan *loading dye* selanjutnya dimasukkan ke sumur agarose.

Pembuatan marker dibutuhkan 2 μ l *gel red* dan 3 μ l marker 100 bp, pipeting dan masukan ke sumur agarose. Selanjutnya yaitu proses elektroforesis pada 135 volt selama 15 menit. Setelah tahap elektroforesis gel agarose di ambil dan dipindahkan ke alat visualisasi DNA yaitu menggunakan *Alpha Innotech Imaging System*.