

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dari empat primer yang digunakan hanya primer GE 1.10 dengan suhu *annealing* sebesar 49,5°C yang dapat dianalisis lebih lanjut. Berdasarkan hasil dendogram yang dihasilkan, primer tersebut dapat membedakan antara variasi DNA ikan sensitif dan resisten. Pada nilai kesamaan 0,8 (80%), 18 sampel DNA dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu kelompok I yang terdiri dari R₁, R₂, R₃ dan R₄. Kelompok II terdiri dari R₅, R₆, R₇ dan R₈. Untuk kelompok III merupakan kelompok sensitif karena semua sampel DNA sensitif mengelompok. Menurut hasil perhitungan migrasi DNA pada gel poliakrilamid kelompok I (alel a dan alel b) memiliki pita pada ukuran 257 pb dan 363 pb, sedangkan kelompok II (alel c dan d) berada pada ukuran 418pb dan 434 pb. Untuk kelompok III (alel c dan e) pita DNA berukuran pada 397 pb dan 418 pb.

B. SARAN

Hasil elektroforesis pada gel poliakrilamid dengan primer GE 1.10 terdapat ukuran pita DNA yang memiliki ukuran dengan perbedaan yang sangat kecil. Akan tetapi, pada gel tersebut masih sulit untuk dibedakan ukurannya. Oleh karena itu, untuk memastikan ukurannya tersebut dapat dilakukan sequencing pada hasil amplifikasinya.

LAMPIRAN I

Protokol Pembuatan Larutan yang Digunakan dalam Penelitian

A. Larutan Stok

1. Buffer TBE 10x

Sebanyak 10,8 gram Tris, 5,5 gram asam borat dan 4 mL EDTA 0,5 M (pH 8,0) dilarutkan dengan air deion hingga volumenya mencapai 100 mL. Selanjutnya larutan disterilkan menggunakan autoklaf.

2. Buffer TAE 50x

Sebanyak 24,2 gram Tris dilarutkan dengan 5,71 asam asetat glacial dengan 10 mL EDTA 0,5 (pH 8,0). Selanjutnya dilarutkan dengan air deion hingga 100 mL, dan larutan disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

3. 1 M Tris (pH 8,0)

12,114 gram Tris dilarutkan dalam 80 mL air deion, lalu dihomogenkan dengan menggunakan stirrer pada alat *magnetic stirrer*, sambil pHnya diseimbangkan hingga mencapai pH = 8,0, dengan menambahkan HCl pekat sedikit demi sedikit. Lalu larutan digenapkan hingga 100 mL. selanjutnya larutan disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

4. 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Sebanyak 18,6 gram EDTA dilarutkan dalam 80 air deion yang dihomogenkan dengan menggunakan stirrer. pH larutan dibuat hingga 8,0 dengan menambahkan NaOH pekat sedikit demi sedikit. Kemudian volumenya digenapkan hingga 100 mL dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

5. Buffer TE

Sebanyak 1 mL Tris HCl 10 mM (pH 8,0) dan 0,1 mL EDTA 1 mM dicampurkan. Lalu volumenya ditambahkan air deion hingga 100 mL, kemudian larutan dihomogenkan dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

6. 30% Akrilamid

Sebanyak 28,5 gram akrilamid dan 1,5 gram bis-akrilamid dilarutkan dengan air deion hingga 100 ml. Larutan yang telah homogen disimpan dalam lemari es.

7. APS (Ammonium Peroxodisulfat) 25 %

Sebanyak 0,25 gram APS dilarutkan dengan air deion hingga 1 mL.

B. Larutan untuk Elektroforesis

1. Buffer TBE 0,5x, 1 liter

Sebanyak 50 mL buffer TBE 10x (larutan stok) dilarutkan dalam air deion sampai 1000 mL. Lalu dihomogenkan.

2. Buffer TAE 1x, 1 liter

Sebanyak 20 mL buffer TAE 50x (larutan stok) dilarutkan dalam air deion sampai 1000 mL. Lalu dihomogenkan

3. Etidium Bromida (EtBr)

Sebanyak 20 μ L EtBr stok 10 mg/mL dilarutkan dengan 100 ml air *monopure* steril di dalam botol gelap atau botol yang telah di tutup seluruh permukaan kacanya dengan aluminium foil.

4. 6x Loading dye

Sebanyak 5 mL gliserol, 0,2 ml EDTA 1mM, 0,025 gram bromophenol blue, 0,025 gram xylene cyanol dan 0,025 gram orange G dilarutkan dengan air deion sampai 100 mL. lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf, kemudian disimpan di *freezer* (-20°C)

5. Gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1x, 40mL

Sebanyak 0,4 gram agarosa dilarutkan dengan buffer TAE 1x sampai 40 mL lalu larutan tersebut dipanaskan dengan menggunakan *microwave* hingga larut dan homogen, selama ± 3 menit, setelah itu ditiriskan hingga larutan gel hangat-hangat kuku $\pm 40^{\circ}\text{C}$, selanjutnya dituangkan pada *tray* yang telah disiapkan.

6. Gel agarosa 2% dalam buffer TBE 0,5x, 40 mL

Sebanyak 0,8 gram agarosa dilarutkan dengan *buffer* TBE 1x sampai 40 mL. lalu larutan tersebut dipanaskan dengan menggunakan *microwave* hingga larut dan homogen, selama ± 3 menit, setelah itu ditiriskan hingga larutan agar hangat-hangat kuku $\pm 40^{\circ}\text{C}$, selanjutnya dituangkan pada *tray* yang telah disiapkan.

7. Gel Poliakrilamida 6% (*plat* 20x20 cm²)

Sebesar 4,5 mL TBE 1x, 9 mL 30% akrilamid, dan 31,5 mL air deion dihomogenkan dengan menggunakan *stirrer* pada *hotplate* (tanpa dipanaskan), kemudian ditambah dengan 220 μL APS 25% dan 25 μL TEMED. Lalu larutan langsung dimasukkan dalam cetakan gel elektroforesis *vertical*.

C. Larutan Isolasi DNA

1. Buffer lisis CTAB 2x, 100 mL

Sebanyak 10 mL Tris HCl 1 M (pH 8,0), 35 mL NaCl 4 M, 4 mL EDTA 0,5 M, 10 mL SDS 10%, 0,2 mL β -mercapethanol dilarutkan dalam 90 mL air deion kemudian larutan dihomogenkan dan ditambahkan dengan 2% CTAB dengan perbandingan larutan : CTAB yaitu 9:1.

2. Potassium Asetat 5 M , 25 mL

Sebanyak 12,2 gram potassium asetat dilarutkan hingga dengan air deion hingga 25 mL, kemudian disterilkan dengan alat autoklaf.

3. Sodium Asetat 3 M , 100 mL

Sebanyak 24,609 gram sodium asetat dilarutkan dengan air deion hingga 25 mL

4. SDS 20%, 50 mL

Sebanyak 10 gram SDS dilarutkan dalam air deion hingga 50 mL, disimpan dalam botol gelap dan dihomogenkan.

5. NaCl 6 M, 100 mL

Sebanyak 35,064 gram NaCl dilarutkan sampai 100 mL dengan menggunakan air deion.

6. Proteinase K, 1 mL

Sebanyak 0,01 gram proteinase K dilarutkan hingga 1 mL dalam air deion Kemudian disimpan dalam *freezer*.

7. CIAA (Kloroform Isoamil Alkohol), 50 mL

Sebanyak 48 ml kloroform dicampur dengan 2 mL isoamil alkohol. Kemudian dihomogenkan dan disimpan dalam botol gelap.

8. RNase bebas DNA (10 mg/mL)

Sebanyak 100 mg (1 botol) RNase dilarutkan dengan air deion hingga 10 mL.

D. Larutan untuk Pewarnaan Perak (*Silver Staining*)

1. 0,1 % CTAB, 100 mL

Sebanyak 0,1 gram CTAB dilarutkan dengan air deion hingga 100 mL.

2. 1,2 % NH₃, 100 mL

Sebanyak 1,2 ml NH₃ dilarutkan dengan air deion hingga 100 mL.

3. Larutan *impregnating*, 100 mL

Sebanyak 0,16 gram AgNO₃ dilarutkan terlebih dahulu dengan air deion hingga 100 mL hingga benar-benar larut kemudian 40 µL NaOH 10 N dan 400 µL NH₃ ditambahkan.

4. Larutan *developing*, 100 mL

Sebanyak 2 gram Na₂CO₃ dilarutkan dengan air deion hingga 100 mL setelah benar-benar larut semua sebanyak 50 µL formamide 37% dicampurkan ke dalam larutan tersebut.

5. Larutan *stop*, 100 mL

0,1 mL asam asetat glasial dilarutkan dengan air deion hingga 100 mL.

LAMPIRAN II

Data Matriks Hasil Amplifikasi Primer Mikrosatelit GE 1.10

Alel ke-	Ikan gurame																	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabel Estimasi frekuensi alel dan nilai heterozigositas dari 18 sampel

DNA ikan gurame yang diinfeksi *A. hydrophila* menggunakan

primer GE 1.10

Alel ke-	X_i	Var X_i	$8X_i^2$	$1 - \frac{Var X_i}{8X_i^2}$	$\sqrt{X_i}$	q_i	Var q_i	H
1	0,72	0,0112	0,5184	0,9783	0,8485	0,8673	0,0038	0,2377
2	0,72	0,0112	0,5184	0,9783	0,8485	0,8673	0,0038	0,2377
3	0,5	0,0138	0,2500	0,9448	0,7071	0,7484	0,0069	0,3903
4	0,27	0,0109	0,0729	0,8504	0,5196	0,6110	0,010	0,4953
5	0,77	0,0098	0,5929	0,9834	0,8774	0,8922	0,0031	0,1985
Rata-rata								0,3119

Tabel perhitungan nilai PIC primer GE 1.10

Alel ke-	Ukuran alel (pb)	Jumlah alel	Proporsi (Pi)	(Pi) ²	PIC
1	257	5	0,1388	0,0190	0,75
2	363	5	0,1388	0,0190	
3	418	9	0,2500	0,0625	
4	434	13	0,3611	0,1303	
5	397	4	0,1111	0,0123	
Jumlah		36		0,2431	

LAMPIRAN III

Cara Menghitung Ukuran Fragmen DNA Hasil Amplifikasi

Larik yang diperoleh pada gel poliakrilamida, merupakan DNA yang mempunyai ukuran tertentu, untuk mengetahui ukuran pasang basanya, larik yang muncul dapat dihitung jarak migrasinya dengan mengacu pada DNA marker yang telah diketahui ukuran panjangnya sebagai DNA standar.

Setiap larik diukur jaraknya mulai dari sumur sampai posisi akhir migrasi. Dengan cara yang sama, larik yang dihasilkan oleh DNA standar pun dihitung. Selanjutnya, jarak migrasi tersebut dituliskan pada tabel. Jarak migrasi DNA standar (cm) sebagai sumbu x, sedangkan nilai log dari nilai pasang basa yang diketahui sebagai sumbu y. Dari pasangan data tersebut, dibuat persamaan garis lurus $y=a+bx$ dengan menggunakan regresi linier. Contohnya adalah sebagai berikut:

Tabel Lampiran 3. Jarak Migrasi DNA Standar pada Gel Poliakrilamida dengan Menggunakan Primer GE 1.10

Jarak migrasi DNA standar (cm)[Sb x]	Ukuran Fragmen DNA standar (pb)	Log pb DNA Standar [Sb y]
7	500	2,6989
8,5	400	2,6020
11	300	2,4771
14	200	2,3010
19,5	100	2,0000

Dari hasil perhitungan berdasarkan regresi linier menggunakan kalkulator dengan data di atas, diperoleh nilai $a= 3,083$ dan nilai $b= -0,0556$. dengan demikian regresi linier fragmen DNA yang menggunakan primer GE 1.10 adalah $y= 3,083 + (-0,0556)x$. Untuk contoh diketahui jarak migrasi suatu fragmen DNA

pada gel poliakrilamida menggunakan primer GE 1.10 adalah 7,5 cm, maka $y=2,666$. anti log $y=2,666$ adalah 463, maka ukuran fragmen DNA tersebut adalah 463 pb.

