

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam penelitian dasar dimana adanya keingintahuan peneliti terhadap hasil suatu aktivitas. Metode penelitian ini deskriptif berkesinambungan, karena dilakukan secara terus-menerus (Nazir, 2003).

B. Objek Penelitian

DNA yang digunakan berasal dari ikan gurame yang sensitif dan resisten terhadap *Aeromonas hydrophila* hasil penelitian Meita (2005) dan Saptiani (2005) serta yang tidak diinfeksi oleh bakteri tersebut.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan sejak bulan Maret sampai September 2009 di Laboratorium Mikrobiologi & Genetika Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

D. Alat dan Bahan yang digunakan

Tabel 3.1 Alat yang digunakan

No.	Alat	Fungsi
1.	Tabung mikrosentrifuga 1,5 mL	Menyimpan hasil isolasi DNA
2.	Lemari es / <i>freezer</i>	Menyimpan sampel, bahan isolasi dan bahan PCR
3.	Pisau bedah dan pinset	Mengambil sisik atau daging atau silur ikan gurame
4.	Botol <i>Duran</i>	Menyimpan larutan
5.	Waterbath	Menginkubasi saat melakukan isolasi DNA
6.	Mikrosentrifuge	Memisahkan molekul menurut berat jenis
7.	Mini spin	Menghomogenkan bahan-bahan PCR
8.	Spatula	Mengambil bahan padatan
9.	<i>Microwave</i>	Melarutkan agarosa
10.	Horizontal elektroforesis	Elektroforesis hasil isolasi dan hasil PCR
11.	<i>Tray dan comb</i>	Mencetak agarosa
12.	<i>UV-transillumeter</i>	Melihat hasil elektroforesis
13.	Mesin PCR	Perbanyak potongan DNA
14.	Vertikal elektroforesis	Elektroforesis hasil PCR
15.	Kaca akrilamida	Mencetak gel poliakrilamida
16.	Bak kaca	Melakukan perwarnaan perak gel poliakrilamida
17.	<i>Magnetic stirer</i>	Menghomogenkan larutan
18.	<i>gloves</i>	Mengurangi kontaminasi dari tangan
19.	Kamera digital	Alat dokumentasi hasil isolasi dan hasil PCR

Tabel 3.2 Bahan yang Digunakan

No.	Bahan	Fungsi
1.	Es batu	Mempertahan suhu sampel tetap dingin
2.	<i>Aquadest</i>	Melepaskan gel poliakrilamid
3.	Air deion	Pelarut yang tidak mengandung ion
4.	Primer DNA	Faktor inisiasi dalam proses PCR
5.	MgCl ₂	Kofaktor dalam proses PCR
6.	Buffer <i>Taq DNA polymerase</i>	Menjaga kondisi optimal <i>Taq</i> polimerasi
7.	<i>Taq DNA polymerase</i> (Merk Fermentas)	Enzim dalam proses PCR

Tabel 3.2 Bahan yang digunakan (lanjutan)

No.	Bahan	Fungsi
8.	Formamide	Mengurangi <i>smear</i>
9.	Larutan TBE dan TAE	<i>Buffer</i> saat elektroforesis untuk menjaga kelancaran pergerakan DNA saat elektroforesis
10.	Gel agarosa dan gel poliakrilamid	Media untuk mengelektroforesis
11.	Pewarnaan perak	Mewarnai elektroforesis hasil PCR
12.	<i>Buffer</i> lisis 2x CTAB	Menghancurkan membran sel
13.	Sodium dodecyl sulfate (SDS) 20%	Melarutkan lemak, mendenaturasi protein
14.	<i>Proteinase K</i>	Memutuskan rantai polipeptida protein
15.	<i>Potassium asetat 5M</i>	Mengendapkan protein yang terdenaturasi
16.	<i>CIAA (Chlorofom -isoamyl alcohol)</i>	Melarutkan protein, mengikat lemak
17.	<i>RNAse</i>	Mendegradasi molekul RNA
18.	Sodium asetat 3M	Mengendapkan protein
19.	Etanol absolut	Mengendapkan asam nukleat
20.	Alkohol 70%	Memisahkan garam-garam yang menempel pada DNA
21.	<i>Buffer TE</i>	Pelarut DNA
22.	<i>Loading dye</i>	Pemberat DNA saat elektroforesis
23.	DNA Marker	Standar ukuran DNA
24.	<i>Ethidium bromide</i>	Pewarna agarosa yang mampu berpendar bila diberi sinar UV

E. Cara Kerja

1. Persiapan alat dan bahan

Sebelum melakukan penelitian, dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan. Persiapan tersebut meliputi pencucian botol-botol *Duran*, pengecekan bahan-bahan yang akan digunakan, pembuatan stok larutan bahan-bahan yang akan digunakan ketika isolasi DNA, elektroforesis horizontal maupun elektroforesis vertikal; sterilisasi tabung mikrosentrifuga 1,5 mL, tabung

PCR, tips dan air deion, kalibrasi mikropipet dan penataan letak bahan-bahan baik dalam lemari maupun sampel ikan di dalam *freezer*.

2. Isolasi DNA

Sampel ikan gurame yang digunakan berasal dari gurame yang resisten dan sensitif terhadap *Aeromonas hydrophila* hasil penelitian Saptiani (2005) dan Meita (2005) disiapkan masing-masing berjumlah sepuluh ekor. Sampel ikan disimpan pada wadah *sterofoam* yang berisi es dan disiapkan pisau, pinset dan gunting yang sebelumnya telah diberi alkohol 70% untuk mencegah kontaminasi mikroba. Kemudian diambil bagian sisik atau daging dari ikan gurame sebanyak $\pm 0,1$ ml atau silur kira-kira sepanjang 0,5 cm. Sisik atau daging atau silur yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga steril berukuran 1,5 ml yang telah diberi tanda S (sensitif) dan R (resisten) masing-masing berjumlah 10 buah. Kemudian, *buffer lysis CTAB 2x fresh* ditambahkan sebanyak 500 μ l dan SDS 20% sebanyak 7 μ l ke dalam tiap tabung mikrosentrifuga. Semua bahan dalam tabung dihomogenkan (dibolak-balik) minimal 50x lalu di inkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Setelah itu, enzim proteinase K sebanyak 10 μ l dimasukkan lalu dihomogenkan terlebih dahulu dan diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 2 jam. Selanjutnya, proteinase K kembali dimasukkan lagi sebanyak 5 μ l lalu dihomogenkan dan diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 16 jam. Untuk mencegah penurunan tinggi air yang banyak, *waterbath* ditutup dengan menggunakan wadah plastik yang kurang lebih seukuran dengan *waterbath*.

Setelah diinkubasi selama semalam, kemudian potassium asetat 5 M ditambahkan ke dalam tabung sebanyak 1/10 volume dan diinkubasi dalam *freezer* selama 20 menit. Setelah 20 menit, tabung disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit dan fasa cair bagian atas (supernatan) yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga baru. Enzim RNase ditambahkan ke dalam tabung tersebut sebanyak 1/100 volume dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Kemudian, kloroform : isoamil alkohol (24:1) sebanyak 1/2 volume dimasukkan ke dalam tabung dan dihomogenkan dengan dibolak-balik minimal sebanyak 50x. Tabung disentrifugasi kembali pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Fasa cair bagian atas dipindahkan kembali ke dalam tabung mikrosentrifuga baru yang steril dan sodium asetat 3 M sebanyak 1/10 volume ditambahkan lalu dihomogenkan. Setelah itu, etanol absolut dingin sebanyak 2x volume ditambahkan dan dihomogenkan. Kemudian, tabung mikrosentrifuga diinkubasi di dalam *freezer* suhu -20⁰ C selama semalam.

Tabung mikrosentrifuga kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit lalu etanol absolute dalam tabung mikrosentrifuge dibuang. Tabung mikrosentrifuga dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 1x volume. Kemudian bagian dalam tabung dikeringkan secara alami dengan membalikkan tabung di atas kertas tisu, setelah DNA kering, sebanyak 30-50 µl TE ditambahkan ke dalam tabung dan dijentik-jentik hingga DNA larut semua. Kemudian, tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dan disimpan dalam *freezer* sebagai DNA stok untuk selanjutnya dilakukan elektroforesis DNA hasil isolasi

3. Elektroforesis DNA hasil isolasi

Sebanyak 20 tabung mikrosentrifuga yang berisi DNA stok resisten dan sensitif dipersiapkan dalam wadah sterofom berisi es. Konsentrasi gel agarose 1% sebanyak 0,4 gran dilarutkan dalam 40 mL *buffer* 0,5 x TAE dengan menggunakan alat *microwave* selama \pm 3 menit. Gel yang telah cair didinginkan terlebih dahulu pada suhu kamar kemudian dalam keadaan hangat-hangat kuku gel dituangkan dalam cetakan bersisir perlahan hingga merata dan didiamkan hingga membeku. Setelah gel membeku kemudian disimpan dalam alat elektroforesis hingga terendam semuanya oleh *buffer* 0,5 x TAE. DNA dari dalam tabung mikrosentrifuga diambil sebanyak 5 μ L dan dicampurkan dengan 2 μ L *loading dye* hingga benar-benar homogen. Dengan hati-hati DNA yang telah dicampurkan *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur gel. Kemudian 3 μ L DNA λ yang dipotong enzim *EcoRI/HindIII* dimasukkan kedalam salah satu sumur sebagai standar ukuran DNA. Setelah semua sumur terisi, sampel DNA dielektroforesis selama 60 menit dengan tegangan 100 volt. Setelah elektroforesis selesai, dilakukan pewarnaan dengan merendam gel selama 5 menit dalam larutan *ethidium bromide* (20 μ L/mL) dan dibilas dengan akuades selama 3 menit. Selanjutnya, hasil elektroforesis diamati dengan menggunakan *UV-Transiluminator* ($\lambda = 520$ nm) dan didokumentasikan dengan kamera digital Nikon Cool-Pix.

4. Uji Kualitas DNA hasil isolasi dengan RAPD

Masing-masing 10 DNA gurame sensitif dan resisten hasil isolasi yang telah diseleksi kemudian diuji dengan penanda RAPD menggunakan primer OPA 2 untuk mengetahui baik atau tidaknya kualitas DNA yang diisolasi. Penggunaan primer RAPD OPA 2 untuk mengetahui kualitas DNA berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Holipah (2006) yang dianggap mampu mengamplifikasi DNA gurame resisten dan sensitif. Sebelumnya terlebih dahulu dilakukan pengenceran DNA mulai dari 5x hingga 20x berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis hasil isolasi.

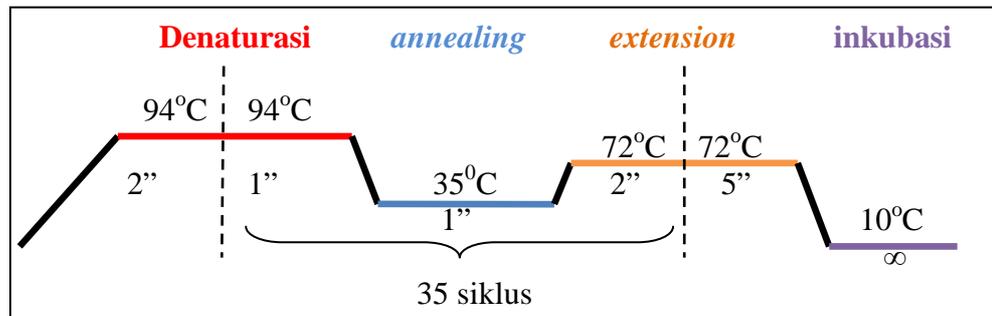
Tabel 3.3 Komposisi Reaksi PCR Primer RAPD

Reagen	Konsentrasi stok	Konsentrasi akhir	Volume 1 reaksi (µl)	Volume 1/2 reaksi (µl)
Air deion steril			16,1	8,05
MgCl ₂	25mM	2mM	2	1
Buffer Taq polymerase*	10x	1x	2,5	1,25
dNTP	100mM untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP dan dTTP	200µM untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP dan dTTP	0,2	0,1
Taq polymerase	5U/ µL	1U	0,2	0,1
DNA			2	1
Primer	32 ng/ µL	32 ng	2	1
Total			25	12,5

* Telah mengandung 2mM MgCl₂ maka total konsentrasi akhir MgCl₂ dalam reksai tersebut sebesar 4mM.

Siklus PCR yang digunakan: denaturasi awal 94°C selama 2 menit dan sebanyak 35 siklus yang terdiri dari 94°C selama 1 menit, suhu *annealing* 35°C

selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit, kemudian ekstensi akhir 72°C selama 5 menit.



Gambar 3.1 Tahapan dan suhu saat PCR dengan primer RAPD

Kemudian hasil amplifikasi dengan mesin PCR "Gene Amplified PCR system 9700" di elektroforesis dengan menggunakan media gel agarosa 1,4 % yang dilarutkan dalam 25 mL *buffer* 0,5x TBE selama 90 menit dengan tegangan sebesar 50 volt. Sebanyak 5 μ L DNA dicampurkan dengan 2 μ L *loading dye* di atas parafilm hingga benar-benar homogen kedua larutan tersebut. Untuk mengetahui ukuran fragmen-fragmen DNA yang muncul digunakan *marker* 100 pb *DNA Mix Ladder* (merek *GeneRuler*TM) sebanyak 3 μ L. Setelah elektroforesis selesai dilakukan, kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *ethidium bromide* selama 5 menit diatas *shaker* dan dicuci dengan *deion water* selama 3 menit dalam keadaan digoyang-goyangkan. Hasil pewarnaan dilihat pada *UV-Transilluminator* ($\lambda = 520$ nm) dan difoto dengan kamera digital Nikon Cool-Pix.

5. Optimasi suhu *annealing* primer SSR

Sebelum melakukan PCR dengan menggunakan primer SSR pada sampel DNA resisten dan sensitif, dilakukan optimasi suhu *annealing* terlebih dahulu. Optimasi tersebut bertujuan untuk mengetahui suhu *annealing* yang cocok sehingga menghasilkan visualisasi pita DNA yang tajam dan spesifik. DNA yang digunakan untuk melakukan optimasi ini adalah DNA gurame yang tidak diinfeksi oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Untuk menentukan suhu *annealing* yang akan dipakai bisa menggunakan rumus $T_a = 4(G + C) + 2(A + T)$ dari setiap primer yang akan dipakai. Rentang optimasi *annealing* dari primer yang dipakai menggunakan suhu-suhu yang lebih tinggi dari optimasi pada penelitian yang telah dilakukan oleh Wahyu (2009) dan Arrizqiyani (2009).

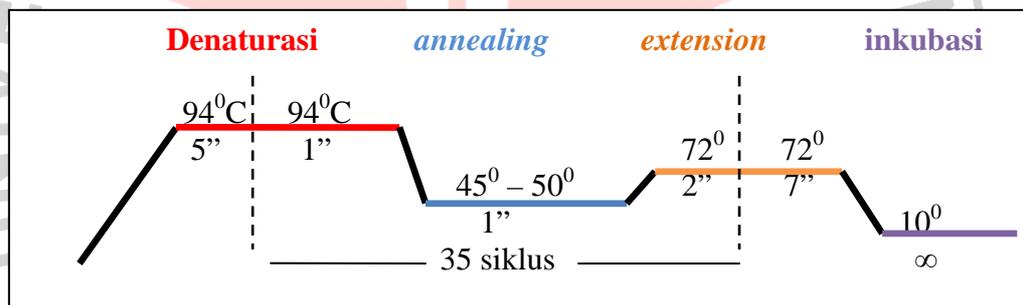
6. Amplifikasi dengan primer SSR

Dilakukan PCR terhadap 10 sampel DNA gurame sensitif dan 10 DNA gurame resisten yang sebelumnya telah teramplifikasi dengan menggunakan penanda RAPD. Amplifikasi menggunakan empat primer SSR yaitu GE 1.4, GE 1.7, GE 1.9 dan GE 1.10. Suhu *annealing* yang digunakan sesuai pada saat melakukan optimasi yang menghasilkan pita jelas yaitu sebesar 49,5°C. Adapun komposisi reaksi PCR SSR yang digunakan terlihat pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Komposisi reaksi PCR *Simple Sequence Repeats* (SSR)

Reagen	Konsentrasi stok	Konsentrasi akhir	Volume 1 reaksi (μ l)
Air deion steril			12,8
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
<i>Buffer Taq</i> *	10x	1x	2
dNTPs	100 mM untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP dan dTTP	200 μ M untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP dan dTTP	0,1
<i>Taq polymerase</i>	5 U/ μ L	0,5 U	0,1
DNA			1
Primer <i>forward</i>	32 ng/ μ L	32 ng	1
Primer <i>reverse</i>	32 ng/ μ L	32 ng	1
Total			20

* Telah mengandung 2mM MgCl₂ maka total konsentrasi akhir MgCl₂ dalam reaksi tersebut sebesar 4mM.



Gambar 3.2 Tahapan dan suhu PCR primer *Simple Sequence Repeats* (SSR)

7. Elektroforesis DNA Hasil PCR

Untuk mengetahui hasil PCR dengan penanda SSR, dilakukan elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 3% (0,75 gram) yang dilarutkan dalam 25 mL *buffer* 0,5x TBE. Sebanyak 5 μ L DNA dari tabung PCR diambil dan dihomogenkan dengan 2 μ L *loading dye* kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa dengan hati-hati. Elektroforesis dilakukan selama 150 menit dengan tegangan 50 volt menggunakan alat elektroforesis horizontal. Selanjutnya

dilakukan elektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid 6% untuk mengetahui ukuran fragmen DNA yang berbeda beberapa pasang basa karena pada gel agarosa tidak dapat terseparasi dengan baik. Sampel DNA sebanyak 5 μ l diambil dari tabung PCR yang telah dicampurkan dengan 2 μ l *loading dye*. Kemudian DNA dimasukkan kedalam sumur - sumur dengan sangat hati-hati dan sebagai pembanding untuk mengetahui ukuran fragmen-fragmen DNA yang muncul digunakan 100 pb *DNA Mix Leader* sebanyak 3 μ l. Elektroforesis dilakukan selama 3,5 jam dengan tegangan 150 volt.

8. Pembuatan gel poliakrilamida

Pada penelitian ini digunakan gel poliakrilamida dengan konsentrasi 6%. Sebanyak 31,5 mL air deion dicampurkan dengan 4,5 mL TBE 10x dan 9 mL akrilamida 30%. Ketiga larutan tersebut dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* tanpa dipanaskan, kemudian dalam keadaan masih dihomogenkan ditambahkan 220 μ L APS dan 25 μ L TEMED. Larutan gel langsung dituangkan di atas cetakan kaca poliakrilamid dengan hati-hati sehingga tidak terbentuk gelembung udara.

9. Pewarnaan perak

Gel poliakrilamida diwarnai dengan pewarnaan perak menurut metode Tegelstrom (1986) yang telah dimodifikasi Aryani 2001. Gel poliakrilamida dilepaskan dari kaca yang dibantu dengan dibasahi oleh aquades kemudian di pindahkan ke dalam bak pewarnaan. Semua proses pewarnaan dilakukan dalam

keadaan di goyang di atas shaker. Tahap pertama pewarnaan yaitu gel direndam dalam larutan yang terdiri dari 0,1 gram CTAB yang dilarutkan dalam 100 mL air deion selama 20 menit. Kemudian larutan pertama diambil secara cepat dengan menggunakan alat *vacum* dan gel dicuci dengan 100 mL air deion selama 20 menit. Air deion yang merendam gel diambil kembali dengan menggunakan alat *vacum*, selanjutnya ditambahkan larutan yang terdiri dari 100 mL air deion + 1,2 mL NH_3 selama 15 menit. Larutan sebelumnya dikeluarkan kembali dan ditambahkan larutan *impregnating* yang terdiri dari 100 mL air deion, 0,16 gram AgNO_3 , 40 μL NaOH 10N dan 0,4 mL NH_3 selama 15 menit. Kemudian gel dicuci dengan 100 mL air deion selama satu menit yang sebelumnya larutan *impregnating* telah dibuang. Larutan *developing* dimasukkan ke dalam bak pewarnaan yang terdiri dari 2 gram Na_2CO_3 yang dilarutkan dalam 200 mL air deion. Sebanyak 100 μL FA 37% *fresh* kemudian dicampurkan dengan Na_2CO_3 yang benar-benar telah larut. Pewarnaan dengan larutan tersebut dilakukan sampai muncul pita-pita DNA. Terakhir gel direndam dalam larutan yang terdiri dari 100 mL air deion yang dicampurkan 0,1 mL CH_3COOH selama satu menit.

10. Analisis Data

Analisis data untuk pita yang muncul pada gel poliakrilamid menggunakan persamaan Nei & Lei. Dengan melambangkan angka 1 untuk adanya pita yang muncul dan angka 0 untuk tidak adanya pita yang muncul. Hasil perhitungan data tersebut kemudian dibuat dendogram dengan metode UPGMA menggunakan

program MVSP pada komputer. Untuk mengetahui nilai heterozigositas dihitung berdasarkan Lynch & Morgan (1994) dengan rumus sebagai berikut :

$$H_{(i)} = 2q_{(i)}[(1 - q_{(i)}) + (2var q_{(i)})]$$

$$var q_{(i)} = \frac{1 - x_{(i)}}{4N}$$

$$q_{(i)} = x_{(i)^{1/2}} \left(1 - \frac{var x_{(i)}}{8x_{(i)}^2} \right)^{-1}$$

$$var x_{(i)} = \frac{x_{(i)} (1 - x_{(i)})}{N}$$

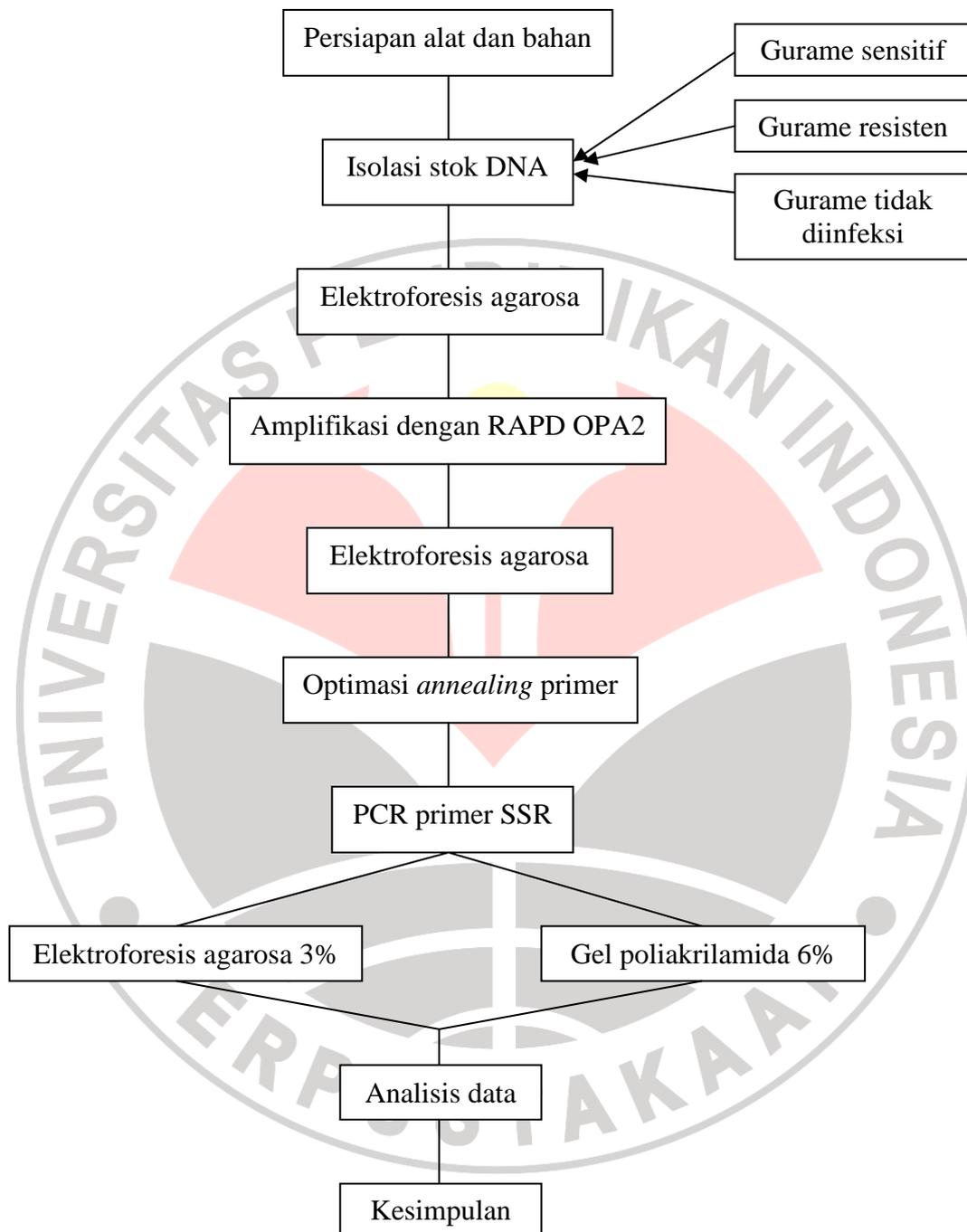
$q_{(i)}$ = nilai frekuensi dan heterozigositas dari populasi

$x_{(i)}$ = frekuensi homozigot resesif "null" pada lokus i

Untuk nilai informasi tingkat polimorfisme (PIC) dengan persamaan :

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 \quad p_i^2 = \text{frekuensi alel ke-i (1,2,3,...dst)}$$

11. Alur penelitian

**Gambar 3.3 Alur penelitian yang digunakan**