

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif.

#### **3.2 Objek Penelitian**

DNA ikan gurame (*Osphronemus goramy* Lac.) yang resisten dan sensitif terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang berasal dari hasil penelitian Saptiani (2005) dan Meita (2005).

#### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

##### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2009 sampai bulan September 2009.

### 3.4 Alat dan Bahan

#### 3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Mikropipet dengan ukuran 0,5-10  $\mu\text{L}$ , 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  beserta tipsnya, *thermocycler* (mesin PCR), *vertical* elektroforesis, *horizontal* elektroforesis, *UV-transilluminator* ( $\lambda = 520 \text{ nm}$ ), mikrosentrifuge, vorteks, lemari es, *freezer*, *waterbath*, autoklaf, timbangan digital, botol Duran dengan ukuran 50, 100, 250, 500 dan 1000 mL, tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL, tabung PCR, *magnetic stirrer with hot plate*, oven, *shaker* dan alat bedah.

#### 3.4.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan antara lain: sisik, daging, dan bagian silur ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.) populasi Blusafir yang resisten dan sensitif terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang berasal dari penelitian Saptiani (2005) dan Meita (2005) serta DNA gurame yang tidak diinfeksi oleh *A. hydrophila*, gel poliakrilamida, gel agarosa, bahan reaksi untuk PCR (*buffer taq*,  $\text{MgCl}_2$ , *taq DNA polymerase*, dNTPs, *primer forward-reverse* mikrosatelit), *Gene Ruler*<sup>TM</sup> *DNA Mix Ladder* #SM0331 (Fermentas), marker DNA  $\lambda$  dipotong *EcoRI/HindIII*, *deion water* ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ), larutan *buffer* TAE (Tris-HCl, asam asetat glasial, EDTA), larutan buffer TBE (Tris-HCl, asam borat, EDTA), bahan isolasi DNA ikan gurame (*buffer lisis* CTAB +  $\beta$ -mercapethanol, SDS (*sodium dedocyl sulfat*), potassium asetat, RNase bebas DNase (Fermentas), sodium asetat, CIAA (kloroform isoamil alkohol),

proteinase-K (Fermentas), TE (Tris-EDTA), *ethanol absolute* dingin, alkohol 70%, *loading dye*, *ethylene glycol*, es batu, bahan untuk pewarnaan perak (CTAB, NH<sub>3</sub>, NaOH, AgNO<sub>3</sub>, formaldehid (FA), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, asam asetat).

### 3.5 Cara Kerja

#### 3.5.1 Persiapan alat dan bahan

Alat dan bahan yang diperlukan dipersiapkan sebelum pelaksanaan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Alat seperti tabung mikrosentifuga 1,5 mL, tabung PCR, tips, botol Duran dan beberapa bahan yang harus disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan untuk isolasi DNA disiapkan dan disimpan pada suhu ruangan, di dalam lemari es (4°C), dan di dalam *freezer* (-20°C), sedangkan semua bahan untuk PCR disimpan dalam *freezer*.

#### 3.5.2 Isolasi DNA

Jumlah sampel DNA ikan gurame resisten dan sensitif yang akan dianalisis masing-masing berjumlah 10 sampel DNA. Proses isolasi DNA dilakukan selama tiga hari. Pada hari pertama, DNA gurame diekstraksi dengan cara mengambil bagian sisik, daging atau silur dari ikan gurame, kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL. Setelah itu secara berturut-turut ditambahkan 500 µL buffer lisis CTAB 2x “fresh” dan 7 µl SDS 20%, lalu dihomogenkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam pada *waterbath*. Selanjutnya setelah 1 jam,

ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  proteinase K, kocok sampai homogen yang selanjutnya diinkubasi kembali pada *waterbath* dengan suhu yang sama selama 2 jam. Setelah 2 jam ditambahkan kembali 5  $\mu\text{L}$  proteinase K, kemudian proses inkubasi dilanjutkan lagi selama  $\pm$  24 jam. Penambahan enzim proteinase K bertujuan agar protein dalam larutan dapat terdegradasi seluruhnya.

Pada hari kedua, sampel diangkat dari *waterbath* dan selanjutnya ditambahkan *potassium* asetat 5M sebanyak 1/10 volume total larutan. Campuran kemudian diinkubasi dalam *freezer* selama 20 menit. Lalu disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung yang baru, kemudian ditambahkan enzim RNase (bebas DNase) sebanyak 1/100 dari volume larutan. Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C untuk mengoptimalkan kerja enzim. Setelah inkubasi selesai ditambahkan kloroform-isoamilalkohol (24:1 v/v) sebanyak 1/2 volume larutan. Campuran tersebut dihomogenkan dengan cara dibolak-balik, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung yang baru, lalu ditambahkan sodium asetat 3 M sebanyak 1/10 volume larutan. Campuran tersebut dihomogenkan kembali dengan cara dibolak-balik sebanyak minimal 50 kali. Untuk presipitasi DNA, ditambahkan etanol absolut sebanyak 2 kali volume larutan lalu disimpan dalam *freezer* selama satu malam pada suhu -20°C .

Pada hari ketiga, campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang secara hati-hati agar DNA tidak ikut terbang. Kemudian sampel DNA dibilas dengan alkohol 70%

dengan hati-hati dan dibuang kembali alkoholnya. Cairan yang masih tersisa di dalam tabung dikeringkan dengan cara membalikan tabung di atas tissue. Setelah kering, ditambahkan TE sebanyak 30-50  $\mu\text{L}$ . Tabung dijentik-jentik sampai DNA larut dalam TE. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dan disimpan dalam *freezer*.

### 3.5.3 Karakterisasi DNA hasil isolasi

Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan sebesar 5:2 (v/v). Campuran DNA dengan *loading dye* diambil dan dimasukkan dengan hati-hati ke dalam sumur-sumur yang ada pada gel agarosa. Selain itu, dimasukan pula marker DNA lambda *HindIII/EcoRI* sebanyak 3  $\mu\text{L}$ . Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1x selama 30 menit pada tegangan 100 volt. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromida (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) selama lima menit di atas shaker, kemudian dibilas dengan aquades selama tiga menit di atas shaker juga. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” ( $\lambda = 520 \text{ nm}$ ) dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

### 3.5.4 Uji Kualitas DNA menggunakan Penanda RAPD OPA2

Sampel DNA hasil isolasi diuji kualitasnya dengan menggunakan penanda RAPD primer OPA2. Penanda ini digunakan karena pada hasil penelitian sebelumnya yaitu Holipah (2006) telah berhasil mengamplifikasi

DNA gurame dan mendapatkan pita-pita DNA yang mudah dianalisis. Sampel DNA gurame resisten dan sensitif diencerkan terlebih dahulu dengan perbandingan *deion water*:DNA, yaitu 19:1 (v/v). Komposisi reaksi PCR RAPD dapat dilihat pada Tabel 3.1. Komposisi reaksi yang digunakan adalah komposisi dengan volume ½ reaksi. Kondisi PCR RAPD yaitu denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 35 siklus terdiri dari tahap denaturasi suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* suhu 35°C selama 1 menit, ekstensi suhu 72°C selama 2 menit, kemudian ekstensi akhir suhu 72°C selama 5 menit.

Tabel 3.1 Komposisi Reaksi PCR RAPD

Larutan Stok	Konsentrasi Stok	Konsentrasi Akhir	Volume 1 Reaksi	Volume ½ Reaksi
ddH <sub>2</sub> O	-	-	16,1 µL	8,05 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM*	2 µL	1 µL
Buffer <i>Taq Polymerase</i> mengandung 2 mM MgCl <sub>2</sub>	10x	1x	2,5 µL	1,25 µL
dNTPs	100 mM	200 µM (@ dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	0,2 µL	0,1 µL
<i>Taq Polymerase</i>	5 U/ µL	1 U	0,2 µL	0,1 µL
Primer OPA2	-	32 ng	2 µL	1 µL
DNA	-	-	2 µL	1 µL
<b>Total</b>			<b>25 µL</b>	<b>12,5 µL</b>

\*Keterangan: total konsentrasi MgCl<sub>2</sub> yang dimasukkan adalah 4 mM.

### 3.5.5 Amplifikasi DNA menggunakan Penanda *Simple Sequence Repeat* (SSR)

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer SSR atau mikrosatelit pada stok DNA gurame resisten dan sensitif. Primer SSR yang digunakan adalah GE 1.b, GEb 2.4, GE 3.1 dan GE 1.3 dengan motif pengulangan (GTT)<sub>10</sub>, (GCA)<sub>10</sub>, (TAA)<sub>10</sub> dan (GCTT)<sub>10</sub>. Tetapi terlebih dahulu dilakukan optimasi suhu *annealing* primer SSR dengan menggunakan DNA yang tidak diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. DNA selanjutnya diamplifikasi melalui proses PCR dengan komposisi reaksi berdasarkan metode Prasetiyono *et al.* (2003b) yang telah dimodifikasi, untuk melakukan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam uji SSR dibutuhkan 20µL yang terdiri atas DNA (1µL), primer forward-reverse (@1µL), 2 µL “*Taq* DNA polymerase reaction buffer”, 0,1 µL *Taq* DNA polymerase, 0,1 µL dNTPs, 2 µL MgCl<sub>2</sub> dan 12,8 µL ddH<sub>2</sub>O. Amplifikasi dilakukan pada alat *Thermocycler* yang diprogram untuk melaksanakan beberapa kondisi. Proses amplifikasi ini diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 94<sup>0</sup>C selama lima menit dan diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 94<sup>0</sup>C selama satu menit, tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 45-50<sup>0</sup>C (tergantung *temperature melting* primer) selama satu menit, tahap ekstensi pada suhu 72<sup>0</sup>C selama dua menit dan ekstensi akhir pada suhu 72<sup>0</sup>C selama tujuh menit. Komposisi reaksi PCR primer SSR dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Komposisi Reaksi PCR SSR

Larutan Stok	Konsentrasi Stok	Konsentrasi Akhir	Volume 1 Reaksi
ddH <sub>2</sub> O	-	-	12,8 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM*	2 µL
Buffer <i>Taq Polymerase</i> mengandung 2 mM MgCl <sub>2</sub>	10x	1x	2 µL
dNTPs	100 mM	200 µM (@ dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	0,1 µL
<i>Taq Polymerase</i>	5 U/ µL	1 U	0,1 µL
Primer <i>reverse</i>	-	32 ng	1 µL
Primer <i>forward</i>	-	32 ng	1 µL
DNA	-	-	1 µL
<b>Total</b>			<b>20 µL</b>

\*Keterangan: total konsentrasi MgCl<sub>2</sub> yang dimasukkan adalah 4 mM.

### 3.5.6 Elektroforesis DNA hasil PCR

DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa untuk cek awal ada tidaknya pita. DNA dielektroforesis pada gel agarosa 3% buffer TBE 0,5x selama 2 jam 30 menit pada tegangan 50 volt. Kemudian pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromida (10 µg/mL) selama lima menit di atas shaker dan dibilas dengan aquades selama tiga menit di atas shaker juga. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” ( $\lambda = 520 \text{ nm}$ ) dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

Selanjutnya, elektroforesis pada gel poliakrilamida digunakan untuk separasi yang lebih baik. Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamida konsentrasi 8% dalam 1x buffer TBE. Tahap-tahap pembuatan gel



poliakrilamida 8% antara lain 28,5 mL *deion water* dicampurkan dengan 4,5 mL TBE 10x dan 12 mL akrilamid 30%. Campuran tersebut diaduk dengan menggunakan *stirrer*. Setelah larutan tercampur, 220  $\mu$ L ammonium persulfat dan 25  $\mu$ L TEMED dimasukkan dan *distirrer* kembali sebentar. Kemudian larutan gel poliakrilamida dimasukkan dengan cepat ke dalam cetakan. DNA sampel yang akan dimasukkan ke dalam sumur gel dicampurkan dengan “loading dye” terlebih dahulu dengan perbandingan 5:2 (v/v). DNA marker  $\lambda$  dipotong *EcoRI/HindIII* atau *Gene Ruler™ DNA Mix Ladder #SM0331* yang merupakan larutan DNA yang sudah diketahui ukuran-ukurannya dielektroforesis bersama-sama dengan DNA sampel sehingga larik DNA sampel dapat diperkirakan ukurannya dengan cara membandingkan dengan ukuran larik DNA marker. Elektroforesis dilakukan selama 4,5 jam pada tegangan 150 volt. Setelah itu gel divisualisasikan dengan pewarnaan perak (*silver staining*).

### 3.5.7 Pewarnaan Perak

Visualisasi gel poliakrilamida dengan pewarnaan perak berdasarkan Tegelstrom (1986) modifikasi Aryani (2001). Pewarnaan gel poliakrilamida dilakukan di atas *shaker*. Gel direndam dalam larutan 1 yang terdiri atas 100 mL ddH<sub>2</sub>O + 0,1 gram CTAB selama 20 menit. Kemudian gel poliakrilamida dicuci dengan 100 mL ddH<sub>2</sub>O selama 20 menit. Selanjutnya gel direndam dalam larutan 2 yang terdiri atas 100 mL ddH<sub>2</sub>O + 1,2 mL NH<sub>3</sub> selama 15 menit. Selanjutnya gel direndam dalam larutan 3 yang terdiri dari 100 mL

ddH<sub>2</sub>O + 40 µL NaOH 10N + 0,16 gram AgNO<sub>3</sub> + 0,4 mL NH<sub>3</sub> selama 15 menit. Kemudian gel dicuci dengan 100 mL ddH<sub>2</sub>O selama satu menit. Selanjutnya gel direndam dalam larutan 4 yang terdiri dari 200 mL ddH<sub>2</sub>O + 100 mL FA 37% + 4 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sampai muncul pita-pita DNA. Langkah terakhir adalah gel direndam dalam larutan 5 yang terdiri dari 100 mL ddH<sub>2</sub>O + 0,1 mL CH<sub>3</sub>COOH selama satu menit. Selanjutnya gel dikeringkan dengan posisi vertikal lalu diamati dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

### 3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan pola larik DNA pada gel poliakrilamida. Proporsi larik monomorfik dan polimorfik dihitung untuk masing-masing primer. Selanjutnya larik DNA hasil elektroforesis diinterpretasikan menjadi angka satu (1) untuk kehadiran larik dan angka nol (0) untuk ketidakhadiran larik. Data matriks tersebut dianalisis untuk mencari nilai heterozigositas dan koefisien kesamaan genetik.

Rumus koefisien kesamaan Nei & Lie (1979) adalah:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

Keterangan:

$S_{xy}$  = Koefisien kesamaan genetik

$N_{xy}$  = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x dan individu y

$N_x$  = Jumlah larik yang dihasilkan individu x

$N_y$  = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu y

Data hasil perhitungan koefisien kesamaan dengan menggunakan persamaan Nei & Lie tersebut, dikonstruksi dendogram dengan menggunakan metode kluster “*unweighted pair group method with arithmetic averages*” (UPGMA) dengan menggunakan *software* MVSP 3.1 (*Multy Variate Statistical Package*). Kemudian dihitung nilai heterozigositas menurut Lynch & Milligan (1994) dan *Polymorphic Information Content* (PIC) agar dapat diketahui seberapa besar kemampuan atau kekuatan dari setiap pasang primer dari lokus mikrosatelit untuk membedakan variasi genetik pada tiap individu ikan gurame yang resisten dan sensitif terhadap *A. hydrophila*.

Rumus heterozigositas pada lokus I adalah:

$$H(i) = 2q(i)[1-q(i)] + 2 \text{ var}[q(i)]$$

Keterangan:

$q(i)$  = nilai frekuensi dan heterozigositas dari populasi

$\text{Var}[q(i)] = \frac{[1-x(i)]}{4N}$ , dengan N adalah ukuran sampel

Adapun untuk menghitung nilai  $q(i)$  tersebut adalah:

$$q(i) = \sqrt{x(i)} \times \left[ 1 - \frac{\text{Var } x(i)}{8x^2} \right]^{-1}$$

Keterangan:

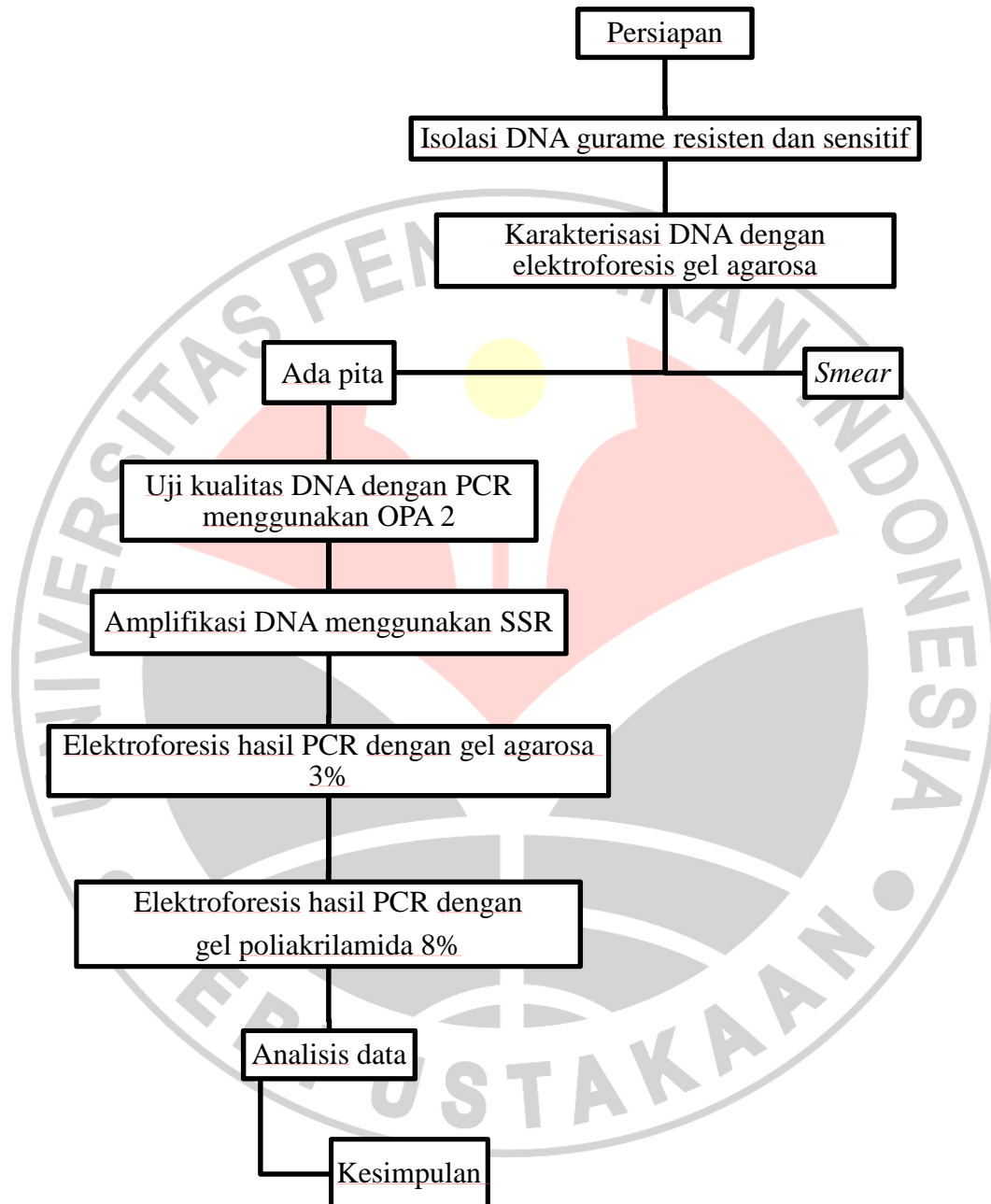
$x(i)$  = frekuensi homozigot resesif ”null” pada lokus i, dan

$\text{Var}[x(i)] = x(i) \times \frac{[1-x(i)]}{N}$ , dengan N adalah ukuran sampel

Adapun rumus PIC yaitu sebagai berikut (Liu, 1998)

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

### 3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian