

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Metode Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian dasar dengan metode deskriptif (Nazir, 1988:61).

B. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah *Hydropsyche sp.* yang berasal dari Sungai Cikapundung yang teraliri oleh limbah. Berdasarkan penelitian Herlianty (2009:45), daerah dari Sungai Cikapundung yang teraliri oleh limbah organik dan dinyatakan tercemar sedang-kritis berdasarkan indeks kimia-fisika adalah Kampung Cikapundung dan Babakan Siliwangi. Oleh karena itu, sampel *Hydropsyche sp.* hanya diambil dari ke dua lokasi di atas dan dari masing-masing lokasi diambil 10 individu untuk dianalisis.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

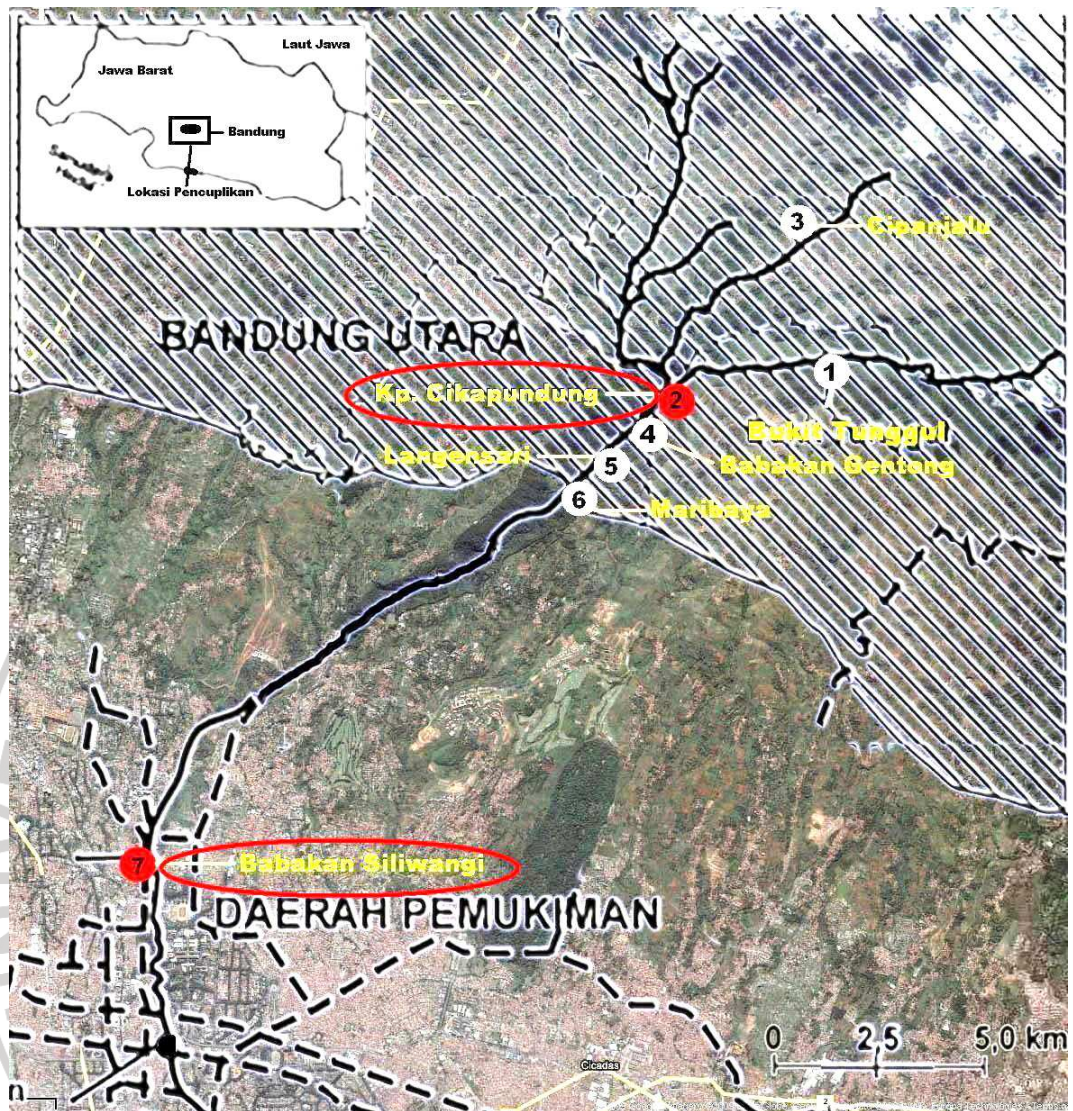
1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi gedung FPMIPA (JICA) Universitas Pendidikan Indonesia dan penelitian ini dilakukan dari bulan Maret sampai bulan Juli 2009. Sedangkan lokasi pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.* dilakukan di sepanjang aliran Sungai Cikapundung. Namun, pada penelitian ini sampel larva *Hydropsyche sp.* yang dianalisis lebih lanjut

hanya berasal dari dua lokasi yaitu Kampung Cikapundung dan Babakan Siliwangi seperti yang tertera pada Gambar 3.1 dengan batas administratif tertera pada Tabel 3.1. Penentuan lokasi berdasarkan atas kemudahan jangkauan dan transportasi sedangkan penentuan kedua lokasi pengambilan sampel tersebut berdasarkan kepada hasil analisis komunitas bentos yang dilakukan pada saat studi pendahuluan.

Tabel 3.1. Lokasi pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.* pada daerah yang teraliri limbah di Sungai Cikapundung

Lokasi	Nama Daerah	Administrasi	Peruntukan lahan	Koordinat	Ketinggian
2	Kampung Cikapundung	Desa Suntenjaya, Kec. Lembang, Kab. Bandung Barat	Pemukiman Penduduk, ladang, perkebunan, peternakan sapi perah	$06^{\circ} 50' 029''$ LS	1351 m dpl
7	Babakan Siliwangi	Kel. Ciumbuleuit, Kec. Cidadap, Kota Bandung	Kawasan pemukiman padat penduduk	$107^{\circ} 42' 548''$ BT	824 m dpl



Gambar 3.1. Peta Lokasi Pengamatan di Sungai Cikapundung, tanda ■ menunjukkan tempat lokasi pengamatan (Surtikanti, 2008b: 67)

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Juli 2009.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Daftar alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terlampir pada Lampiran I.

2. Bahan

Daftar Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian terlampir pada Lampiran II.

E. Alur Penelitian

Alur penelitian terlampir pada Lampiran III.

F. Langkah Penelitian

Langkah penelitian ini terbagi menjadi 2 tahap yaitu (1) pra penelitian dan (2) penelitian. Tahap pra penelitian terdiri dari (a) Persiapan alat dan bahan; (b) Penentuan lokasi pengambilan sampel; (d) Pengambilan sampel *Hydropsyche sp.* di lapangan, sedangkan tahap penelitian terdiri dari (a) Pengukuran parameter fisika-kimia air (b) Seleksi metode isolasi DNA; (c) Isolasi DNA *Hydropsyche sp.*; (d) Elektroforesis DNA hasil isolasi; (e) Seleksi primer PCR; (f) Amplifikasi DNA; (g) Elektroforesis DNA hasil PCR; dan (h) Analisis data.

1. Tahap Pra Penelitian

a. Persiapan

Persiapan yang dilakukan di laboratorium sebelum melakukan penelitian diantaranya mempersiapkan alat yang akan dipakai seperti: *micropestle*, pinset, tips, tabung mikrosentrifuga 1.5 mL dan tabung. Selain itu, dilakukan pembuatan terhadap semua bahan yang akan digunakan dan disimpan sesuai pada tempat yang tepat. Sedangkan persiapan yang dilakukan di lapangan meliputi : survey lapangan dilakukan di sepanjang DAS Cikapundung kemudian dilakukan analisis lanjut dengan melihat parameter fisik-kimiawi air sungai pada 2 daerah yang dinyatakan tercemar yaitu Kampung Cikapundung dan Babakan Siliwangi. Pengamatan parameter fisik-kimiawi air sungai yang dianalisis meliputi warna air sungai, bau, rasa, dan pH (derajat keasaman) dengan menggunakan pH indikator pada masing-masing lokasi yang akan dijadikan sebagai lokasi penelitian

b. Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel Benthos

Penentuan lokasi pengambilan sampel benthos dilakukan berdasarkan tata guna lahan dan kemudahan dalam jangkauan transportasi mulai dari daerah Gunung Bukit Tunggul hingga daerah Babakan Siliwangi dan dua anak sungai lainnya, yaitu Sungai Cisarua dan Sungai Cigulung. Hasilnya menunjukkan bahwa daerah yang teraliri limbah atau tingkat pencemarannya cukup tinggi adalah di daerah Kampung Cikapundung dan Babakan Siliwangi sehingga proses pengambilan sampel *Hydropsyche sp.* hanya dilakukan pada dua daerah tersebut.

c. Pengambilan Sampel Benthos di Lapangan

Berdasarkan hasil studi pendahuluan yang dilakukan oleh Herlianty (2009:59) dengan menggunakan *Biological Monitoring Working Party* (BMWP), sampel benthos yang ditemukan di setiap lokasi adalah *Hydropsyche sp.* Oleh karena itu, pengambilan sampel benthos dilakukan hanya pada *Hydropsyche sp.* Pengambilan sampel benthos dilakukan dengan cara memilih spesimen yang ada pada kedua lokasi penelitian pada saat survey yaitu Kampung Cikapundung dan Babakan Siliwangi.

Benthos diambil dari sungai dengan jala Surber dengan menggunakan metode “*kick sampling*” atau zig-zag dan “*hand sampling*” atau dengan tangan. Selanjutnya dengan menggunakan pinset atau sikat gigi spesimen ditaruh ke dalam Cawan Petri. Sampel dibersihkan dengan cara dibilas dengan akuades. Benthos yang telah dibilas dikeringkan di atas tisu kemudian disimpan dalam botol yang berisi alkohol 70%. Botol-botol tersebut kemudian disimpan dalam *cooler box*. Setelah tiba di laboratorium botol berisi spesimen tersebut disimpan dalam freezer pada suhu -20°C . Gambar pada saat survey beserta lokasi terlampir pada lampiran IV dan lampiran V.

2. Tahap Penelitian

a. Pengukuran Parameter Fisik-Kimiawi air

Pengukuran parameter fisik-kimiawi air sungai di lapangan meliputi *Dissolved Oxygen* (DO), Konduktivitas, dan pH (derajat keasaman). Pengukuran parameter-parameter tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1) Oksigen Terlarut/ *Dissolved Oxygen* (DO)

Oksigen terlarut diukur dengan menggunakan metode titrasi *Winkler* (Michael, 1984)

2) Konduktivitas/ Daya Hantar Listrik (DHL)

Konduktivitas diukur dengan menggunakan alat berupa konduktivimeter. Pengukuran tersebut dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

3) pH (derajat keasaman)

Derajat Keasaman (pH) diukur dengan menggunakan pH meter.

Pengukuran kandungan kimia lainnya berupa BOD dan kandungan logam (Cu, Pb, Zn) dilakukan di Laboratorium Kimia Lingkungan Keairan Pusat Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Air (PUSAIR), Departemen Pekerjaan Umum Bandung.

b. Seleksi Metode Isolasi DNA

Seleksi metode isolasi DNA dilakukan dengan membandingkan dua metode isolasi yaitu metode isolasi Watanabe (2008:380) dan metode isolasi Nwilene (2006:50) yang telah dimodifikasi. Perbedaan pada kedua metode isolasi diatas adalah adanya penambahan potassium asetat sebanyak 5M. Tujuan dilakukan seleksi metode isolasi DNA untuk mendapatkan metode isolasi DNA *Hydropsyche sp.* yang paling tepat dan memberikan hasil yang memuaskan secara kualitatif.

DNA *Hydropsyche sp.* diekstraksi menggunakan metode Watanabe (2008:380) yang telah dimodifikasi. Tiap individu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL. Setelah itu secara berturut-turut ditambahkan 500 μ L *buffer* lisis CTAB 2x, 7 μ L SDS 20 %, 2 μ L β -Merchaptanol 1% dan 10 μ L proteinaseK. Penambahan enzim proteinase K bertujuan agar protein dalam larutan dapat terdegradasi seluruhnya. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 3 jam pada *waterbath*.

Setelah 3 jam ditambahkan potasium asetat 5M sebanyak $\frac{1}{10}$ volume larutan, kemudian dihomogenkan dan selanjutnya diinkubasi kembali pada freezer dengan suhu -20°C selama 20 menit. Setelah 20 menit, sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang baru dan ditambahkan kloroform-isoamilalkohol (CIAA) sebanyak $\frac{1}{2}$ volume larutan dan dihomogenkan. Kloroform-isoamilalkohol (24:1 v/v) yang ditambahkan ini bertujuan untuk proses pemurnian DNA.

Sampel kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang baru dan ditambahkan 3M sodium asetat sebanyak $\frac{1}{10}$ volume larutan. Selanjutnya ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 2x volume total larutan dan dihomogenkan. Sampel kemudian diinkubasi di dalam *freezer* pada suhu -20°C selama 1 malam.

Setelah satu malam, campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang secara hati-hati agar DNA tidak ikut terbang, kemudian ditambahkan alkohol 70% dingin (4°C) sebanyak 1x volume larutan dan langsung dibuang kembali secara hati-hati. Cairan yang masih tersisa didalam tabung dikeringkan menggunakan *vacuum* kemudian setelah kering ditambahkan TE sebanyak 30-50 μL dan RNase sebanyak $\frac{1}{10}$ volume TE yang ditambahkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan disimpan ke dalam *freezer* pada suhu -20°C .

Selanjutnya DNA *Hydropsyche sp.* diekstraksi menggunakan metode Nwilene (2006:50) yang telah dimodifikasi dengan langkah-langkah sebagai berikut: tiap individu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL. Setelah itu ditambahkan 500 μL *buffer* lisis CTAB 2x dan *Hydropsyche sp.* diekstrak sampai halus. Setelah itu berturut-turut dimasukkan 7 μL SDS 20%, 2 μL β -mercaptoetanol dan 10 μL proteinase K. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 3 jam pada *waterbath*. Selanjutnya, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan

yang terbentuk dipindahkan dalam tabung baru dan ditambah CIAA (24:1) sebanyak 1/10 volume. Campuran larutan tersebut kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang baru dan ditambahkan sodium asetat 1/10 volume dan etanol absolut sebanyak 2 x volume kemudian diinkubasi semalam pada suhu -20°C.

Setelah satu malam, campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang secara hati-hati agar DNA tidak ikut terbang, kemudian ditambahkan alkohol 70% dingin (4°C) sebanyak 1x volume larutan dan langsung dibuang kembali secara hati-hati. Cairan yang masih tersisa didalam tabung dikeringkan menggunakan *vacum* kemudian setelah kering ditambahkan TE sebanyak 30-50 µL dan RNase sebanyak $\frac{1}{10}$ volume TE yang ditambahkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan disimpan ke dalam *freezer* pada suhu -20°C.

c. Isolasi DNA

Tahap isolasi DNA dilakukan berdasarkan hasil seleksi metode isolasi DNA. Metode isolasi yang digunakan adalah metode yang menghasilkan kualitas DNA dengan hasil paling baik. Stok DNA dibuat 10 replikasi dari dua lokasi pengambilan sampel.

d. Elektroforesis Hasil Isolasi

Sebelum DNA hasil isolasi dijadikan sebagai DNA templat pada proses PCR, dilakukan karakterisasi secara kualitatif dengan cara elektroforesis. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TBE 0,5x (*Buffer* TBE 10x diencerkan dengan aquades dengan perbandingan 1:49 v/v) selama 30 menit pada tegangan 100 volt. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan 5:2 (v/v) kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumur di dalam gel, selain itu dimasukkan pula marker *Eco-RI* sebanyak 3 μ L. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromide (10 μ g/mL) selama lima menit kemudian dibilas dengan akuades selama tiga menit. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” dan didokumentasikan menggunakan kamera digital Nikon Coolpix 2200 (Watanabe, 2008:380).

e. Seleksi Primer

Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan kondisi yang paling sesuai untuk DNA *Hydropsyche sp.* yang akan diamplifikasi. Optimasi dilakukan terhadap komponen PCR yaitu primer. Seleksi dilakukan terhadap 20 primer Operon set-A 10-mer antara lain OPA1-OPA20 (Operon Technologies, Inc). Seleksi primer ini dilakukan untuk mendapatkan primer acak yang paling tepat digunakan untuk amplifikasi DNA *Hydropsyche sp.* yang telah dikarakterisasi. Sikuen primer RAPD OPA2-OPA20 tertera pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Urutan Primer RAPD OPA2 -OPA20

Kode Primer	Sikuen Primer (5'-3')	Kode Primer	Sikuen Primer (5'-3')
OPA1	CAGGCCCTTC	OPA11	CAATCGCCGT
OPA2	TGCCGAGCTG	OPA12	TCGCGATAG
OPA3	AGTCAGCCAC	OPA13	CAGCACCCAC
OPA4	AATCGGGCTG	OPA14	TCTGTGCTGG
OPA5	AGGGGTCTTG	OPA15	TTCCGAACCC
OPA6	GGTCCCTGAC	OPA16	AGCCAGCGAA
OPA7	GAAACGGGTG	OPA17	GACCGCTTGT
OPA8	GTGACGTAGG	OPA18	AGGTGACCGT
OPA9	GGGTAACGCC	OPA19	CAAACGTCGG
OPA10	GTGATCGCAG	OPA20	GTTGCGATCC

f. Amplifikasi DNA

DNA hasil isolasi selanjutnya diamplifikasi melalui proses Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan komposisi reaksi berdasarkan metode Watanabe (2008: 380) yang telah dimodifikasi. Primer RAPD yang didapat dari hasil seleksi digunakan untuk amplifikasi semua sampel DNA *Hydropsyche sp.* (20 sampel dari 2 lokasi pengamatan). Komposisi reaksi amplifikasi DNA menggunakan *Thermocycler* terdiri dari: 32 ng DNA sebanyak 1 μ L, 16 ng primer RAPD 1 μ L,

Taq polymerase (1 U/ μ L), $MgCl_2$ (4 mM), *buffer Taq polymerase* 1x, 0,2 mM dNTPs (0,1 μ L untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP dan dTTP) dan *deion water* ditambahkan hingga volume total mix 12,5 μ l (Tabel 3.5).

Tabel 3.3. Komposisi Reaksi PCR

Larutan Stok	Konsentrasi Stok	Konsentrasi Akhir	Volume 1 Reaksi (μ l)	Volume $\frac{1}{2}$ Reaksi (μ l)
$MgCl_2$	25mM	4mM	2,00	1,00
<i>Buffer Taq polymerase</i>	10x	1x	2,50	1,25
<i>Taq polymerase</i>	5 U/ μ L	1U	0,20	0,10
dNTPs	100 mM	0,2 mM	0,20	0,10
DNA	32 ng / μ L	16 ng/ μ L	2,00	1,00
Primer RAPD	32 ng / μ L	16 ng/ μ L	2,00	1,00
<i>Deion water</i>			16,10	8,05
Total			25,0	12,50

Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR secara berurutan, diawali dengan *deion water*, $MgCl_2$, *buffer Taq polymerase* kemudian dihomogenkan dengan cara dijentik-jentik. Setelah itu, baru diambil dNTPs dan *Taq polymerase* dari dalam *freezer* kemudian ditambahkan ke dalam tabung PCR yang telah berisi campuran bahan tadi. Setelah semua bahan dimasukan ke dalam tabung kemudian dihomogenkan dengan cara dijentik-jentik dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. Lalu disiapkan tabung-tabung PCR yang telah diberi nama atau kode.

Campuran bahan yang telah homogen dimasukkan kedalam tabung-tabung PCR dengan volume yang sama sebanyak 10,5 μ L, kemudian ditambahkan DNA *Hydropsyche sp.* juga primer ke dalam masing-masing tabung. Pembuatan komponen reaksi PCR tersebut dilakukan dalam keadaan dingin untuk menjaga kinerja beberapa zat yang mudah rusak yaitu dNTPs dan *Taq polymerase*.

Alat *Thermocycler* melakukan proses amplifikasi pada suhu 94°C untuk denaturasi awal selama 2 menit, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang diawali dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit. Untuk tahap penempelan primer pada DNA templat (*annealing*) dilakukan pada suhu 35°C selama 1 menit, kemudian tahap *ekstension* pada suhu 72°C selama 2 menit. Rangkaian proses dari denaturasi sampai polimerasi disebut dengan satu siklus. Pada siklus yang terakhir dilakukan polimerasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Amplifikasi dilakukan sekurang-kurangnya dua kali dan hanya produk yang direproduksi yang diambil dan disimpan untuk analisis data selanjutnya.

g. Elektroforesis DNA hasil PCR

DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa 1,5% dalam buffer TBE 0,5x selama 90 menit pada tegangan 50 volt. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan 5:2 (v/v) kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumur di dalam gel, selain itu dimasukkan pula marker *DNA ladder 100 bp SM 0331* Fermentas sebanyak 3 μ L. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromide (10 μ g/mL) selama

lima menit kemudian dibilas dengan akuades selama tiga menit. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” dan didokumentasikan menggunakan kamera digital Nikon Coolpix 2200 (Watanabe, 2008:380).

h. Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan pola larik DNA pada gel agarosa. Proporsi larik DNA dihitung untuk masing-masing primer. Pada penelitian ini, larik yang dianalisis adalah larik yang hadir dan jelas terlihat oleh mata, tanpa memperhitungkan intensitasnya. 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 (Watanabe, 2008:380).

Koefisien kesamaan yang digunakan untuk menguji pasangan objek yang dibandingkan sesuai koefisien Nei dan Lie.

Rumus kesamaan Nei dan Lie :

$$S_{xy} = 2n_{xy}/n_x+n_y$$

Keterangan :

S_{xy} = Koefisien kesamaan genetik (Nei dan Lie)

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

n_x = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x

n_y = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu y

Data hasil perhitungan koefisien kesamaan tersebut, dikonstruksi dendogram dengan metode kluster *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages* (UPGMA) menggunakan software MVSP 3.1 (*Multivariate Statistical Package Ver.3.1*). Setelah itu, dilakukan perhitungan nilai heterozigositas. 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

$$\text{var}[x(i)] = \frac{[1 - X(i)]}{4N}, \text{ dengan } N \text{ adalah jumlah sampel}$$

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

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

Keterangan:

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

$$\text{var}[q(i)] = \frac{[1-x(i)]}{4N}$$

Setelah itu dilakukan perhitungan nilai PIC (*Polymorphism Information Content*) dengan persamaan:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 \quad i = 1, 2, 3, 4, \dots, n$$

Keterangan :

p_i^2 adalah frekuensi alel ke- i

Perhitungan nilai PIC (*Polymorphism Information Content*) dilakukan untuk mengetahui tinggi rendahnya tingkat informasi dan memberikan perkiraan kekuatan pembeda dari penanda RAPD yang digunakan.

