BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode penelitian deskriptif.

B. Lokasi Penelitian

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

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi yang digunakan adalah populasi ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.) varietas bluesafir yang berasal dari daerah Tasikmalaya.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan yang resisten dan ikan yang sensitif terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* hasil penelitian Kurniadie (2005) dan Meita (2005). Sampel ikan gurame merupakan sampel ikan hasil infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara oral dan rendam. Sampel ikan yang resisten dan sensitif tersebut sudah mati dan disimpan di dalam *freezer.*
3. Primer yang digunakan adalah primer hasil penelitian Kusumawaty *et al*., (2008) yang telah melakukan pengembangan metode pengayaan mikrosatelit pada ikan gurame dengan menggunakan metode seleksi

potongan DNA sebelum pustaka DNA tanpa menggunakan zat radio aktif berdasarkan metode edwards *et al*.,(1996). Dari penelitian tersebut berhasil dirancang sebelas primer mikrosatelit untuk gurame yaitu GE 1,3; GE 1,4; GEB3; GE 3.1; GE 3.3; GEB1a; GEB1b; GE 1.10; GE 1.7; GE 1.9 dan GE 2,4. Tetapi dalam penelitian ini hanya empat primer mikrosatelit yang digunakan yaitu:GEb3; GE 3.3; GE 3.1; dan GEB1b.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin PCR "*Gene Amplified PCR system 9700*" dari PE Amplified Biosystem, mikrosentrifuga "Hettich Zentrifugen EBA 12", alat elektroforesis horizontal "anvantec PS-520", alat lektroforesis vertikal "Biorad", Lemari Es, waterbath, botol duran (ukuran 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml dan 1000 ml), mikropipet, tips mikropipet (ukuran 10 µl, 200 µl dan 1000 µl), tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 ml dari "oxygen", tabung PCR ukuran 0,2 ml dari "Oxygen", wadah plastik, vorteks, UV-Transilluminator "High Performance Ultraviolet Transilluminator" (λ = 520 nm), *shaker, hot plate* dan *magnetic stirrer*, Kamera digital Nikon, plastik tahan panas, alumunium foil, sarung tangan karet dan tissue.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan gurame hasil penelitian Kurniadie & Meita (2005), tris HCl 1M pH 8 pro analytic (pa), *buffer* lisis CTAB 2%, *proteinase K*, etanol 100% (pa), etanol 70% (pa), *buffer* TE

(1M Tris-HCl pH 8.0 dan 0,5 M EDTA pH 8.0), EDTA, *buffer* PCR dari Fermentas, dNTPs 10 mM (dATPs, dGTPs, dTTPs, dCTPs), $MgCl_2$, primer mikrosatelit hasil penelitian Kusumawaty, *et al*., (2008), yaitu GEb3, GE 3.3, GE 3.1, GEB1b, enzim *Taq Polymerase* dari Fermentas, Ultra-pure ™ agarosa dari Invitrogen, Buffer TAE (Tris 0,89M, Asam asetat Glasial 0,2M dan EDTA 0,5M) 50x, *buffer* TBE (Tris 0,89M, asam borat 0,89M dan EDTA 0,5M) 10x, *aquades*, ethidium bromide 10 mg/ml, kloroform-isoamil alkohol 24:1 (v/v), akrilamida 30%, bis akrilamida, APS 25%, TEMED dari *Biorad*, perak nitrat, asam asetat, Na_2CO_3, Formaldehid 30%, NH_3, NaOH 10 N.

E. Metode Kerja

Urutan metode kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Isolasi DNA

DNA gurame diekstraksi dengan cara mengambil bagian sisik dari ikan gurame, kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran I,5 ml. Setelah itu secara berturut-turut ditambahkan 500 µl buffer lisis CTAB 2x, 0,2 µl mercaptanol, 7 µl SDS 20%. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65^oC selama 1 jam pada *waterbath*. Selanjutnya setelah 1 jam ditambahkan 10 µl proteinase K, kocok sampai homogen kemudian diinkubasi kembali pada *waterbath* dengan suhu yang sama selama 2 jam. Setelah 2 jam ditambahkn kembali 10 µl *proteinase* K , kemudian proses inkubasi dilanjutkan lagi selama $\pm$ 24 jam. Penambahan enzim *proteinase* K bertujuan agar protein dalam larutan dapat terdegradasi seluruhnya.

Setelah inkubasi selesai, sampel diangkat dari *waterbath* dan selanjutnya ditambahkan potasium asetat 5M sebanyak 1/10 volume total larutan. Campuran kemudian diinkubasi dalam *freezer* selama 20 menit. Lalu disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung yang baru, kemudian ditambahknan enzim *RNAse* (bebas *DNAse*) sebanyak 1/100 dari volume larutan. Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37^{o}C untuk mengoptimalkan kerja enzim.

Pemurnian DNA dilakukan dengan menggunakan bahan kloroform-isoamilalkohol (24:1 v/v) yang ditambahkan sebanyak ½ volume larutan. Campuran tersebut dihomogenkan dengan cara dibolak-balik hingga berwarna seperti susu, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung yang baru, lalu ditambahkan sodium asetat 3M sebanyak 1/10 volume larutan. Campuran tersebut dihomogenkan kembali dengan cara dibolak-balik sebanyak 50x. Untuk presipitasi DNA, ditambahkan etanol absolut sebanyak 2 kali volume larutan lalu disimpan selama satu malam pada suhu -20^{o}C .

Setelah satu malam campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang secara hati-hati agar DNA pelet tidak ikut terbuang. Selanjutnya DNA pelet dikeringkan di dalam oven selama 15 menit. DNA pelet yang kering ditambahkan TE sebanyak 30-50 µl. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 15 menit dan disimpan pada suhu -20^{o}C.

2. Penomoran Sampel

Untuk memudahkan pengenalan tabung yang berisi DNA sampel, maka dilakukan pengkodean dengan membagi dua kelompok, yaitu kelompok ikan yang resisten yang dilambangkan dengan huruf R dan ikan yang sensitif dengan huruf S.

3. Karakterisasi DNA Hasil Isolasi

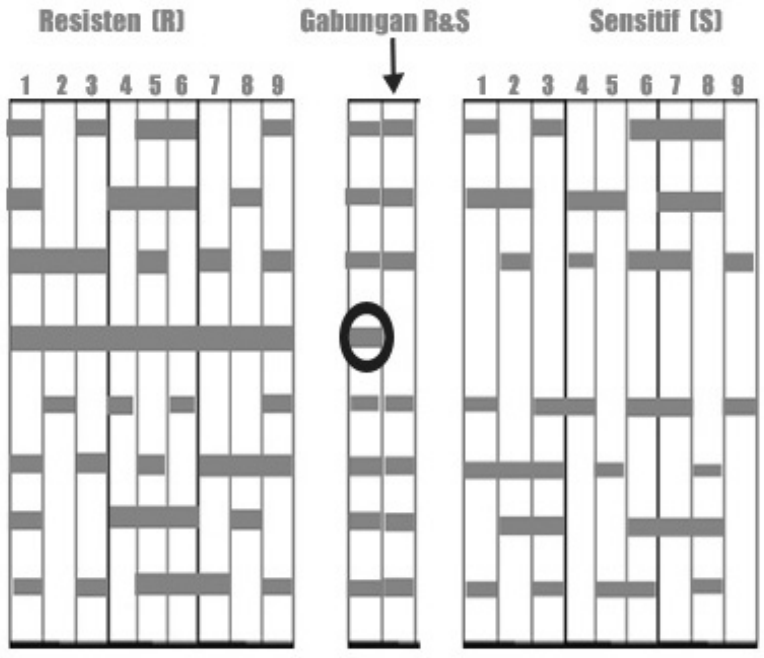
Sebelum larutan DNA hasil isolasi dijadikan sebagai cetakan DNA pada proses PCR, dilakukan karakterisasi secara kualitatif dengan cara elektroforesis. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1x selama 30 menit pada tegangan 100 volt. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarose pada larutan ethidium bromide (10 µg/ml) selama dua menit kemudian dibilas dengan aquades selama tiga menit. Selanjutnya gel diamati pada "UV-Transiluminator" (λ = 520 nm) dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

4. Metode BSA (*Bulk Segregation Analysis)*

Dalam mengamplifikasi sampel DNA yang berasal dari ikan-ikan yang diinfeksi oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*, dilakukan dengan metode BSA (*Bulk segregation analysis*). Metode BSA secara luas telah digunakan sebagai alat untuk menemukan penanda yang terpaut dengan gen tertentu, yang mana metode BSA ini sangat efektif untuk pemetaan resolusi tinggi dalam menemukan gen pengendali sifat tertentu seperti gen resisten terhadap penyakit tertentu. Secara tidak langsung metode BSA juga digunakan untuk peta keterpautan dan untuk

menyaring penanda yang terpaut dengan QTL (*Quantitative trait loci*) (Liu, 1998).

Metode *bulk* yang sukses akan menghasilkan suatu fenotif atau genotif tertentu yang mana akan muncul suatu alel yang spesifik dalam suatu *bulk* yang tidak muncul dalam *bulk* lainnya. Perbedaan pola frekuensi larik juga akan terlihat untuk suatu penanda yang terpaut dalam alel target. Suatu penanda yang polimorfik akan menunjukkan perbedaan yang bersih antara dua *bulk* yang sepertinya terpaut dalam gen target (Liu, 1998). Bagan tentang metode BSA dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. *Bulk Segregation Analysis* (BSA)
(Kusumawaty *et al*., 2008)

Pada metode *bulk* ini akan digabungkan stok DNA dari setiap individu kelompok gurame yang tahan terhadap bakteri *A. hydrophila* menjadi satu *bulk* dan kelompok gurame yang tidak tahan terhadap bakteri *A. hydrophila* menjadi satu *bulk*. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer mikrosatelit pada

kedua stok DNA gabungan tersebut. Sampel DNA kemudian diamplifikasi melalui proses PCR dengan komposisi reaksi berdasarkan metode Prasetiyono *et al*., (2003) yang dimodifikasi. Apabila DNA *bulk* hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan primer mikrosatelit dari kedua kelompok gurame tersebut dielektroforesis dan menghasilkan pola larik yang berbeda dan terdapat larik yang spesifik yang membedakan keduanya, maka akan dilakukan amplifikasi ulang dengan primer yang sama untuk seluruh sampel DNA tiap individu baik DNA gurame resisten maupun DNA gurame sensitif terhadap bakteri *A. hydrophila*. Hal ini bertujuan untuk memastikan apakah larik yang spesifik tersebut merupakan larik DNA spesifik yang dominan terdapat pada salah satu kelompok DNA ikan gurame hasil pengujian.

5. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Pada penelitian ini empat macam primer mikrosatelit (GEB3, GE 3.3, GE 3.1, dan GEB1b) digunakan untuk analisis variasi genetik pada ikan gurame. Campuran reaksi PCR ini dibuat berdasarkan Prasetiyono *et al*. (2003) yang dimodifikasi. Campuran reaksi untuk setiap tabungnya mengandung 200 µM untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP; 32 ng primer, 1 U *Taq* DNA polymerase; 2 mM $MgCl_2$; 1x buffer PCR; 1µl (DNA stok diencerkan 20x, kemudian diambil 1µl) dan air deion steril dingin yang ditambahkan hingga volumenya 20 µl. Komposisi reaksi PCR untuk primer mikrosatelit disajikan dalam Tabel 3.1

Tabel 3.1 Komposisi Reaksi PCR untuk Mikrosatelit

Larutan Stok	Konsentrasi Akhir	Volume 1x Reaksi (µl)
DNA		1 µl
Buffer PCR 10x	Buffer PCR 1x	1,25 µl
25 mM $MgCl_2$	2 mM	2 µl
5U/µl *Taq* DNA *polymerase*	1 U	0,1 µl
100 mM dNTPs	200 µM (untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP)	0,1 µl
32 ng/µl primer forward	32 ng	1µl
32 ng/µl primer reverse	32 ng	1µl
Air deion		Volume Total 20 µl

Setiap tabung PCR berisi 20 µl larutan reaksi PCR. Pembuatan reaksi PCR tersebut dilakukan secara hati-hati dan cepat di dalam wadah berisi es untuk menjaga keefektifan kerja beberapa zat yang digunakan seperti dNTPs dan *Taq polymerase* yang mudah rusak.

Selanjutnya tabung yang berisi komponen reaksi PCR dimasukkan ke dalam alat DNA *thermal cycler* yang sebelumnya telah dinyalakan selama 30 menit. Karena alat telah diprogram sebelumnya, maka alat dapat langsung digunakan. Alat *thermal cycler* melakukan proses amplifikasi yaitu pada suhu 94^{o}C selama 5 menit untuk tahap denaturasi awal terhadap DNA ikan gurame, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang diawali dengan proses denaturasi pada suhu 94^{o}C selama 1 menit, *annealing* (penempelan primer) dilakukan pada suhu 37-45^{o}C selama 1 menit, dilanjutkan dengan proses perpanjangan primer pada suhu 72^{o}C selama 2 menit. Perpanjangan primer terakhir pada suhu 72^{o}C selama 7 menit. Sampel DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel poliakrilamida.

6. Elektroforesis DNA Hasil PCR dengan Menggunakan Gel Poliakrilamida

DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel poliakrilamid. Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamid dengan konsentrasi 6% dalam 1x.buffer TBE**.** Sebelum DNA sampel dimasukkan ke dalam sumur gel, DNA sampel dicampurkan dengan " loading dye" dengan perbandingan 5:2 (v/v). Selain itu, digunakan marker (DNA lamda Hind III/EcoR1 dan *DNA Ladder 100 pb*) 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 pada gel poliakrilamid dilakukan selama 3,5 jam pada tegangan 150 Volt.

Setelah proses elektroforesis selesai, selanjutnya gel poliakrilamida diwarnai dengan menggunakan pewarnaan perak menurut Tegelstrom (1988) yang telah dimodifikasi Aryani (2001). Pewarnaan gel poliakrilamida dilakukan di atas *shaker*. Pewarnaan diawali dengan gel direndam dalam larutan 1 yang terdiri atas 100 ml ddH_2O + 0,1 gram CTAB selama 20 menit. Kemudian gel poliakrilamida dicuci dengan 100 ml ddH_2O selama 20 menit. Selanjutnya gel direndam dalam larutan 2 yang terdiri atas 100 ml ddH_2O + 1,2 ml NH_3 selama 15 menit. Selanjutnya gel direndam dalam larutan 3 yang terdiri dari 100 ml ddH_2O + 40 µl NaOH 10N + 0,16 gram $AgNO_3$ + 0,4 ml NH_3 selama 15 menit. Kemudian gel dicuci dengan 100 ml ddH_2O selama satu menit. Selanjutnya gel direndam dalam larutan 4 yang terdiri dari 100 ml ddH_2O + 50 ml FA 37% + 2 gram Na_2CO_3 sampai muncul pita-pita DNA. Langkah terakhir adalah gel direndam dalam larutan 5 yang terdiri dari 100 ml ddH_2O + 0,1 ml CH_3COOH selama satu menit.

Selanjutnya gel dikeringkan dengan posisi vertikal lalu diamati dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

Foto larik DNA yang diperoleh kemudian dianalisis untuk menetukan polimorfisme berdasarkan pola larik yang terdokumentasi. Setiap hasil amplifikasi diidentifikasi berdasarkan ukuran larik dalam pasangan basa untuk setiap primer yang digunakan.

7. Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan pola larik DNA pada gel poliakrilmida. 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, PIC (*Polimorfic Information Content)* dan koefisien kesamaan genetik. Nilai frekuensi alel dan heterozigositas dihitung berdasarkan Lynch dan miligan (dalam Lia, 2006). Heterozigositas pada lokus i (H) adalah:

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

Dimana var [q(i)] =[1-x(i)]/4N dan (q) adalah frekuensi alel resesif ”null” pada lokus i:

$$q(i) = \sqrt{x(i)}\left[1 - \left[\frac{\mathrm{var}\,[q(i)}{8\,x(i)^2}\right]\right]^{-1}$$

x(i) = Frekuensi homozigot resesif ”null” pada lokus i

var [x(i)] = x(i) [1- x(i)]/N dimana N adalah jumlah sampel

Polimorfic Information Content (PIC) digunakan untuk memperkirakan rendahnya tingkat informasi suatu penanda genetik. Nilai PIC memberikan perkiraan kekuatan pembeda dari penanda genetik yang digunakan dengan cara menghitung frekuensi alel dari suatu populasi yang diteliti. Analisis PIC tiap lokus menggunakan rumus:

$$PIC=\sum_{i}^{n} pi^2$$

pi adalah frekuensi dari alel ke-i dari lokus mikrosatelit yang diteliti. Proporsi (Pi) merupakan jumlah alel ke-i yang hadir pada individu sampel dibagi jumlah alel total dalam lokus (Nagaraju *et al*., 2002).

Koefisisen kesamaan yang digunakan untuk menguji pasangan objek yang dibandingkan adalah 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 menggunakan metode klaster "*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages*" (UPGMA) dari MVSP 3.1 *software*. Pada penelitian ini, larik yang dianalisis adalah larik yang hadir dan jelas terlihat oleh mata, tanpa memperhitungkan intensitasnya.