

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif bertujuan untuk memberikan gambaran atau penjelasan mengenai peristiwa, situasi, objek, atau fenomena tertentu, termasuk karakteristik dari variabel-variabel yang dapat diuraikan dalam bentuk angka maupun kata-kata (Kim dkk., 2017). Tujuan dari penelitian deskriptif juga untuk menguraikan fakta-fakta atau sifat-sifat yang terkait dengan fenomena yang sedang diteliti (Lukas dkk., 2020). Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu kultur *Chlorella* sp., identifikasi spesies berdasarkan morfologi, isolasi DNA, analisis kualitatif dan kuantitatif hasil isolasi DNA, amplifikasi gen 18S rRNA, sekuensing gen 18S rRNA, identifikasi spesies berdasarkan gen 18S rRNA, perancangan *single guide RNA* (sgRNA) secara *in silico*, dan perancangan plasmid untuk aktivasi-CRISPR pada gen anhidrase karbonat secara *in silico*.

#### **3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian**

##### **3.2.1 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juni 2024.

##### **3.2.2 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini bertempat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Proses sekuensing sampel hasil amplifikasi PCR gen 18S rRNA dilakukan oleh First BASE Laboratories, Selangor, Malaysia.

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah *Chlorella* sp. yang dikultur pada media ekstrak taugé 4% (MET) dan AF6. Sampel dari kultur tersebut kemudian diambil untuk proses isolasi DNA, amplifikasi PCR, dan sekuensing gen 18S rRNA. Penelitian ini juga memanfaatkan urutan sekuens gen 18S rRNA dari berbagai spesies dalam genus *Chlorella* yang diperoleh dari GenBank *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) sebagai referensi dan pembanding dalam konstruksi pohon filogenetik. Selain itu, urutan sekuens gen anhidrase karbonat dari *Chlorella sorokiniana* yang juga diperoleh dari GenBank NCBI digunakan untuk perancangan *single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid untuk aktivasi-CRISPR pada gen anhidrase karbonat.

### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Rincian alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1 dan Lampiran 2.

### 3.5 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini, terdapat beberapa prosedur yang dilakukan untuk mencapai hasil yang diharapkan. Prosedur ini dibagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap persiapan sebelum penelitian, tahap pelaksanaan penelitian di laboratorium, dan tahap analisis secara *in silico*. Tahap persiapan meliputi kegiatan yang dilakukan sebelum penelitian dimulai. Tahap pelaksanaan penelitian di laboratorium mencakup kultur *Chlorella* sp., identifikasi spesies berdasarkan morfologi, isolasi DNA, analisis kualitatif dan kuantitatif hasil isolasi DNA, amplifikasi gen 18S rRNA, dan sekuensing gen 18S rRNA. Tahap terakhir adalah tahap analisis *in silico* yang melibatkan analisis filogenetik, perancangan *single guide RNA* (sgRNA), dan perancangan plasmid aktivasi-CRISPR gen anhidrase karbonat.

### 3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan disiapkan sesuai dengan kebutuhan penelitian dan jumlahnya disesuaikan dengan keperluan. Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian disiapkan dan dipastikan tidak ada kendala. Sebelum digunakan, alat yang sudah tersedia dibersihkan terlebih dahulu dan disterilisasi menggunakan *waterbath* (PS-40A) pada suhu 60°C selama 30 menit serta autoklaf (LS-100 LJ) pada suhu 121°C selama 15 menit untuk mencegah adanya kontaminasi (Asfi & Angriani, 2024), kemudian alat disimpan atau ditutup dengan kertas.

### 3.5.2 Kultur dan Pengamatan Pertumbuhan *Chlorella* sp.

Sampel *Chlorella* sp. dikultur dalam media ekstrak tauge 4% (MET) dan AF6 (Merck) di dalam labu Erlenmeyer (Pyrex) berukuran 250 mL dengan jumlah sampel sebanyak 10% dari total keseluruhan sampel dan media. Media tersebut disterilkan dengan cara di-autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, sel *Chlorella* sp. dikultur pada *shaker* (Eyela Thermo Shaker) dengan kecepatan 130 rpm pada suhu ruang dengan siklus pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap (Chang dkk., 2020). Pertumbuhan *Chlorella* sp. diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10 UV) pada panjang gelombang 680 (OD<sub>680</sub>) dengan mengambil sampel sebanyak 1 mL setiap 24 jam selama 15 hari pada sekitar pukul 16.00 WIB.

Hubungan antara OD<sub>680</sub> dan konsentrasi biomassa (mg/L) diperoleh berdasarkan persamaan berikut (Nayak dkk., 2016):

$$N = 2,27 \times OD_{680} - 0,0845$$

Keterangan:

- N adalah konsentrasi biomassa (mg/L)
- OD<sub>680</sub> adalah kerapatan optik pada panjang gelombang 680 nm

Laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) mikroalga dihitung menggunakan persamaan (Jeong dkk., 2020):

$$\mu = \frac{\ln \left( \frac{N_2}{N_1} \right)}{t_2 - t_1}$$

Keterangan:

- $\mu$  adalah laju pertumbuhan spesifik ( $\text{hari}^{-1}$ )
- $N_1$  adalah biomassa pada waktu  $t_1$
- $N_2$  adalah biomassa pada waktu  $t_2$
- $t_1$  dan  $t_2$  adalah waktu pengukuran biomassa

### 3.5.3 Identifikasi Spesies *Chlorella* sp. Berdasarkan Morfologi

Pengamatan morfologi sampel *Chlorella* sp. dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Yazumi) dengan perbesaran 100x. Identifikasi morfologi spesies mikroalga dilakukan berdasarkan karakteristik-karakteristik yang dapat diamati. Morfologi mikroalga yang terisolasi dicatat secara fotografis dengan pembesaran 100x menggunakan kamera *handphone* (Realme Narzo RMX3516).

### 3.5.4 Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan Metode CTAB

Metode isolasi DNA yang digunakan mengacu pada metode Doyle & Doyle (1987) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 10 mL sampel *Chlorella* sp. disentrifugasi pada 10.000 rpm (Hettich EBA 12) selama 1 menit untuk memperoleh pelet *Chlorella* sp. yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 mL (Eppendorf). Selanjutnya, ditambahkan 600  $\mu\text{l}$  *buffer* CTAB yang terdiri dari 1,4 M NaCl (Merck), 100 mM Tris (Himedia), 20 mM EDTA (Himedia), 1% CTAB (Bio Basic Inc.), dan 2% polivinilpirrolidon (Bio Basic Inc.). Campuran tersebut direndam dalam sonikator *waterbath* pada suhu 65°C selama 1 jam, kemudian ditambahkan 1 volume larutan CI, yaitu kloroform (Merck) dan isoamil alkohol (Merck) dengan perbandingan 24:1, dan dibolak-balik selama 10 menit. Setelah itu, campuran disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 menit.

Supernatan dipindahkan ke tabung mikro berukuran 1,5 mL yang baru untuk dilakukan proses purifikasi. Proses purifikasi dilakukan dalam dua tahap. Pada tahap pertama, etanol 70% (Onemed) dingin ditambahkan sebanyak dua kali volume. Selanjutnya, DNA diendapkan dengan penambahan 0,1 volume amonium asetat (Merck) 3 M dan 4  $\mu$ l RNase (Promega) ditambahkan untuk menghilangkan kontaminan RNA yang tercampur dengan DNA. DNA dipisahkan melalui proses sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Pelet DNA kemudian dipurifikasi kembali dengan 400  $\mu$ l etanol 70% dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk dikeringkan pada suhu ruang hingga etanol menguap sepenuhnya. Hasil isolasi DNA dilarutkan dalam 50  $\mu$ L air deionisasi (Onelab Waterone) steril dan disimpan pada suhu 4°C.

### **3.5.5 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Hasil Isolasi DNA *Chlorella* sp.**

Analisis kualitatif DNA hasil isolasi dilakukan dengan metode elektroforesis gel agarosa. Gel agarosa 1% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram agarosa (Promega V3121) dalam 50 mL *buffer* TBE 1x dalam botol sampel 250 mL (Duran). Larutan agarosa dipanaskan menggunakan *hot plate* (Faithful) hingga mendidih dan menjadi bening, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu hangat. Sebanyak 3  $\mu$ L pewarna Gel Red (Promega) ditambahkan ke dalam larutan agarosa dan dihomogenkan secara perlahan. Setelah itu, gel dituangkan ke dalam cetakan dan dibiarkan memadat selama sekitar 30 menit. Gel yang telah padat dimasukkan ke dalam perangkat elektroforesis (Mupid Exu) yang telah diisi dengan *buffer* TBE 1x hingga gel tenggelam (sekitar 500 mL). Selanjutnya, sumur pertama dari kiri diisi dengan 6  $\mu$ L 10 kb campuran marka DNA yang terdiri dari marka DNA (GN1000bp) dicampur dengan *loading dye* (Promega) dalam rasio 5:1. Sumur lainnya diisi dengan campuran *loading dye* dan DNA hasil isolasi dengan perbandingan 1:5. Gel agarosa dijalankan pada tegangan 50 volt selama 60 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat dan didiamkan selama 10 menit, kemudian diamati di bawah UV transiluminator (BluPAD).

Analisis kuantitatif hasil isolasi DNA dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur kemurnian dan konsentrasi DNA.

Aris Muhamad Nurjamil, 2024

*PERANCANGAN PLASMID SINGLE GUIDE RNA (SGRNA) AKTIVASI-CRISPR GEN ANHIDRASE KARBONAT *Chlorella sorokiniana* Shihira dan Krauss*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur dengan cara menentukan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $\lambda$  260/280). DNA diencerkan dengan perbandingan 5:245 menggunakan air deionisasi, kemudian dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam kuvet kuarsa (Digilife) yang telah disterilisasi. Sebanyak 250  $\mu$ L larutan *blanko*, yaitu air deionisasi, dibuat untuk kalibrasi alat. Tombol “*measure sample*” pada spektrofotometer ditekan untuk memulai pengukuran panjang gelombang secara otomatis dan hasil kuantifikasi akan langsung ditampilkan pada layar alat. Kemurnian DNA dihitung berdasarkan perbandingan absorbansi pada 260 nm dan 280 nm dengan standar kemurnian DNA berada dalam rentang 1,8-2,0 (Dewanata & Mushlih, 2021). Rumus-rumus berikut digunakan untuk menghitung kemurnian, konsentrasi, dan total DNA yang diisolasi berdasarkan hasil absorbansi yang diperoleh dari spektrofotometer:

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Keterangan:

- $A_{260}$  adalah absorbansi pada panjang gelombang 260 nm
- $A_{280}$  adalah absorbansi pada panjang gelombang 280 nm

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times \text{faktor pengenceran} \times 50$$

Keterangan:

- $A_{260}$  adalah absorbansi pada panjang gelombang 260 nm
- Faktor pengenceran adalah rasio antara volume larutan akhir dan volume sampel awal sebelum diencerkan
- 50 adalah konstanta yang digunakan untuk mengubah nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm menjadi konsentrasi dalam  $\mu$ g/mL

$$\text{Total DNA} = \text{konsentrasi DNA} \times \text{volume total}$$

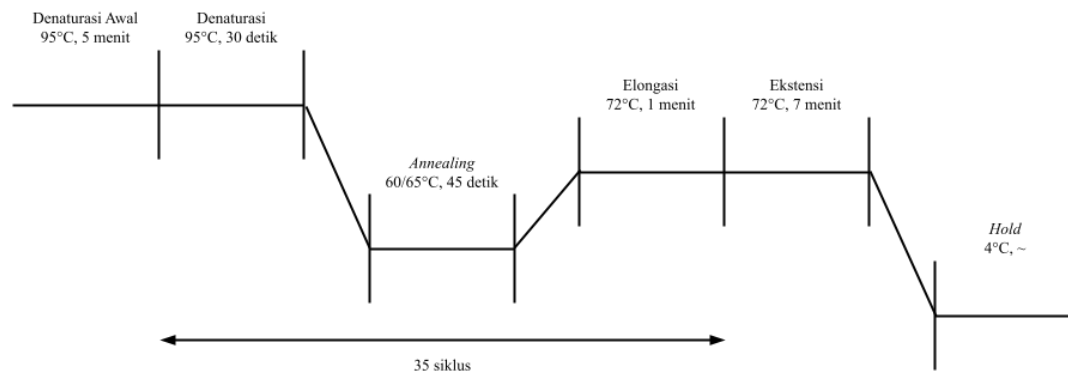
### 3.5.6 Amplifikasi Gen 18S rRNA *Chlorella* sp.

Proses amplifikasi gen 18S rRNA *Chlorella* sp. dilakukan menggunakan *thermal cycler* (Applied Biosystem ABI GeneAmp 9700). Dua pasang primer untuk gen 18S rRNA *Chlorella* sp., yaitu primer 18S dan primer ss3 + ss5 (Tabel 3.1), dipilih karena telah teruji dalam penelitian Khaw dkk. (2020) dapat menghasilkan satu pita tunggal pada hasil PCR. Target amplifikasi PCR gen 18S rRNA *Chlorella* sp. adalah 1.796 pb untuk primer 18S dan 1.790 pb untuk primer ss3 + ss5. Komposisi bahan PCR yang digunakan meliputi GoTaq Green Master Mix (Promega), ddH<sub>2</sub>O (Onelab Waterone), primer *forward* dan *reverse* (Macrogen), serta DNA *template*.

Tabel 3.1 Primer yang Digunakan dalam Amplifikasi Gen 18S rRNA *Chlorella* sp.

Primer	Sekuens (5'→3')	Kandungan GC (%)	Panjang Primer (pb)	T <sub>m</sub> (°C)
18S (F)	CCTGGTTGATCCTGC CAG	61	18	62.3
18S (R)	TTGATCCTTCTGCAG GTTCA	45	20	58.8
ss3	GATCCTTCCGCAGGT TCACCTACGGAAACC	56	30	71.1
ss5	GGTGATCCTGCCAGT AGTCATATGCTTG	50	28	64.8

Primer yang akan diuji dan DNA hasil isolasi dari *Chlorella* sp. disiapkan untuk melakukan amplifikasi. Campuran PCR dibuat dengan komponen 12,5 µL GoTaq Green Master Mix yang mengandung 2x GoTaq Green Reagent, 7,5 µL ddH<sub>2</sub>O, 1 µL primer *forward*, 1 µL primer *reverse*, dan 3 µL DNA *template*, sehingga volume akhir campuran PCR menjadi 25 µL. Program PCR diatur seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.1 dengan tahapan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti oleh denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 60°C untuk primer 18S dan pada suhu 65°C untuk primer ss3 + ss5 selama 45 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit yang dilakukan selama 35 siklus. Proses amplifikasi diakhiri dengan ekstensi pada suhu 72°C selama 7 menit (Khaw dkk., 2020).



Gambar 3.1 Program PCR untuk Amplifikasi Gen 18S rRNA (Khaw dkk., 2020)

Pengujian keberhasilan dan kualitas amplicon PCR dilakukan dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 1% selama 30 menit dengan tegangan 100 volt. Sebanyak 3–5  $\mu$ L sampel dimasukkan ke dalam sumur gel tanpa penambahan *loading dye*. Keberhasilan amplifikasi PCR dapat dinilai melalui elektroforesis dengan kriteria munculnya pita DNA tunggal dengan ukuran amplicon yang sesuai target, yaitu 1796 pb untuk primer 18S dan 1790 pb untuk primer ss3 + ss5, serta tidak adanya pita DNA yang mengalami *smear* atau fragmentasi.

### 3.5.7 Sekuensing Gen 18S rRNA *Chlorella* sp.

Hasil amplifikasi gen 18S rRNA dari *Chlorella* sp. menggunakan primer 18S dan ss3 + ss5 disekuensing dengan menggunakan paket pengurutan siklus terminator BigDye® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Kit* di First BASE Laboratories yang berlokasi di Selangor, Malaysia. Proses sekuensing urutan nukleotida dilakukan dengan mesin ABI PRISM 3730xl *Genetic Analyzer*. Metode yang diterapkan dalam sekuensing adalah metode Sanger. Pengiriman sampel dilakukan oleh PT. Genetika Science Indonesia yang berlokasi di Kota Tangerang, Banten.

### 3.5.8 Analisis Bioinformatika

Hasil sekuensing diperoleh dalam bentuk *file* dengan ekstensi AB1, SEQ, dan grafik kromatogram yang menunjukkan puncak-puncak dengan warna berbeda untuk setiap basa. Perangkat lunak BioEdit digunakan untuk menganalisis hasil pembacaan sekuens. Hasil sekuensing yang baik ditandai dengan grafik yang menunjukkan

Aris Muhamad Nurjamil, 2024

PERANCANGAN PLASMID SINGLE GUIDE RNA (SGRNA) AKTIVASI-CRISPR GEN ANHIDRASE KARBONAT *Chlorella sorokiniana* Shihira dan Krauss

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



puncak-puncak tinggi dan terpisah jelas satu sama lain. Sebaliknya, hasil pembacaan yang kurang baik ditandai dengan puncak-puncak yang landai dan tidak terpisah dengan jelas (Untu dkk., 2015). Hasil pembacaan ini dibuang dan tidak dilanjutkan untuk analisis lebih lanjut. Proses sekuensing dua arah dilakukan dengan pembacaan primer *forward* dan *reverse*. Hasil pembacaan tersebut disusun menjadi sebuah *contig* untuk mendapatkan sekuens konsensus yang utuh. Sekuens konsensus yang diperoleh kemudian disimpan dalam format FASTA.

Identitas dari sekuens konsensus yang diperoleh ditentukan dengan melakukan pencarian menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* untuk nukleotida (BLASTn) di situs web *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Hasil dari BLASTn menunjukkan sekuens-sekuens yang memiliki homologi dengan sekuens konsensus yang diperoleh.

Sekuens gen 18S rRNA dari berbagai spesies *Chlorella* dikumpulkan dengan ketentuan merupakan sekuens lengkap (*complete sequence*) dan memiliki panjang lebih dari 1.600 pasang basa untuk konstruksi pohon filogenetik. Seluruh sekuens gen yang telah diperoleh disejajarkan (*alignment*) menggunakan perangkat lunak MEGA versi 11 dengan metode *Align by ClustalW*. Setelah dilakukan *alignment*, bagian-bagian dari sekuens yang tidak diinginkan dihapus melalui proses *trimming* untuk menyesuaikan jumlah sekuens agar seluruh sekuens memiliki panjang yang sama. Konstruksi pohon filogenetik kemudian dilakukan menggunakan metode *Neighbor-joining Tree* dengan 1.000 kali *bootstrap* (Pangestika dkk., 2015).

### 3.5.9 Identifikasi Gen Anhidrase Karbonat

Pencarian gen anhidrase karbonat dilakukan dengan mengakses basis data nukleotida di situs web *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan kata kunci “*carbonic anhydrase*” dan “*Chlorella*”. Sekuens gen yang diperoleh kemudian diidentifikasi untuk menentukan bagian-bagian pentingnya, termasuk urutan pengkodean (*coding sequence/CDS*), situs mulai transkripsi (*transcription start site/TSS*), dan daerah -100 hingga -400 dari TSS. Daerah -100

hingga -400 dari TSS ini selanjutnya akan digunakan untuk perancangan *single guide RNA* (sgRNA) (Jiang dkk., 2014).

### 3.5.10 Perancangan *Single Guide RNA* (sgRNA)

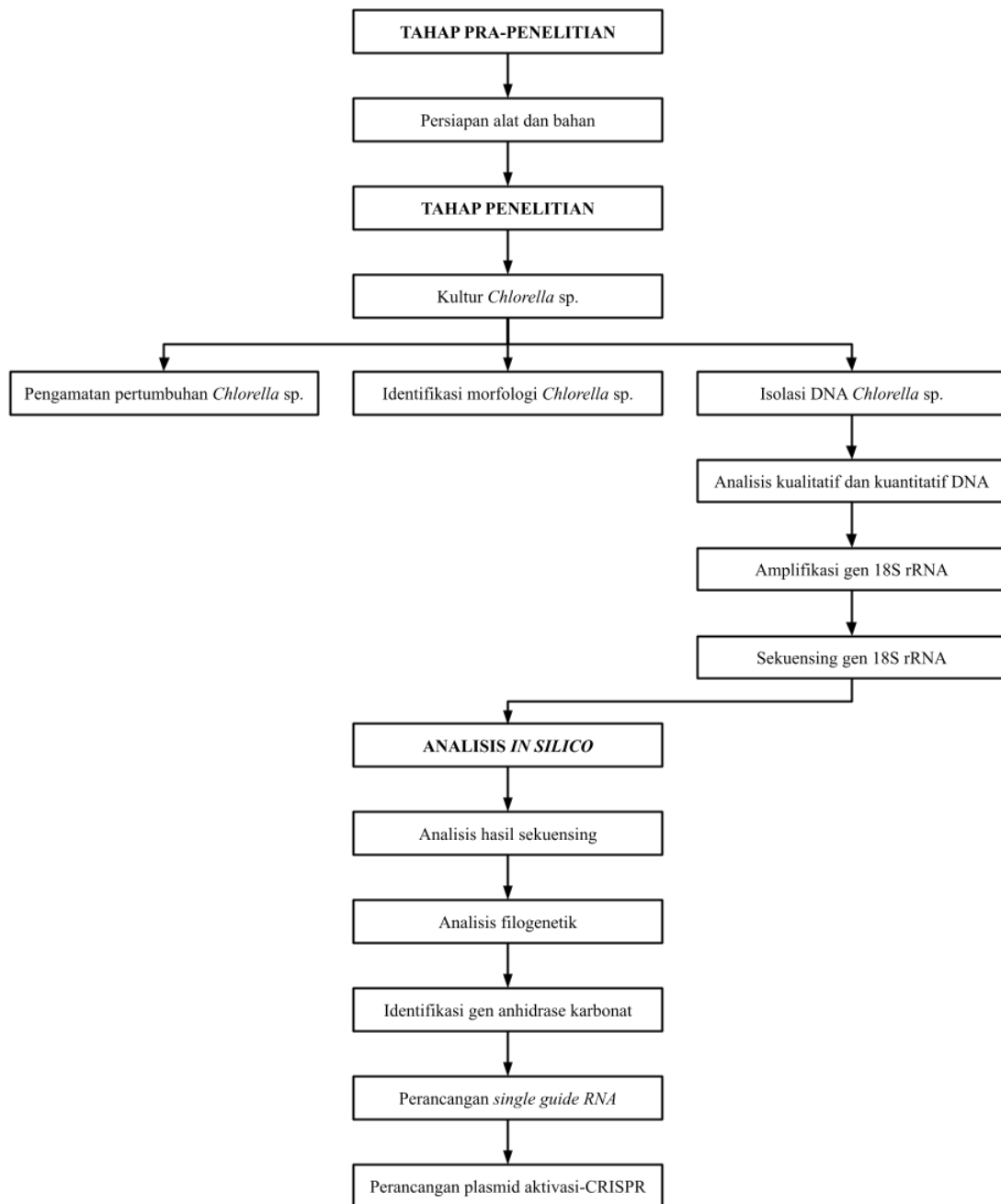
Perancangan sgRNA dilakukan dengan menggunakan situs web Cas-Designer. *Single guide RNA* dirancang pada daerah -100 hingga -400 dari situs mulai transkripsi (*transcription start site/TSS*). Pada tahap ini, beberapa kandidat sgRNA ditampilkan oleh Cas-Designer bersama dengan sekuens, kandungan GC, untai, dan posisinya. *Single guide RNA* dipilih berdasarkan kriteria kandungan GC (antara 40% hingga 80%) dan panjang basa (17 hingga 24 basa) (Kurihara dkk., 2022; Mohammadhassan dkk., 2023).

### 3.5.11 Perancangan Plasmid Aktivasi-CRISPR Gen Anhidrase Karbonat

Perancangan plasmid aktivasi-CRISPR untuk gen anhidrase karbonat dilakukan secara *in silico* menggunakan situs web Benchling. Sistem aktivasi-CRISPR dirancang dengan cara menggantikan fragmen Cas9 pada plasmid pHSE401 dengan dCas9 yang dikombinasikan dengan subunit aktivasi VP64 dari plasmid pHSN6A01. Proses ini dimulai dengan pemotongan kedua plasmid pada situs restriksi XbaI dan SacI, kemudian fragmen dCas9-VP64 digabungkan ke dalam plasmid pHSE401. Setelah itu, sgRNA yang telah dirancang disisipkan di antara situs pemotongan BsaI (Lin & Ng, 2020).

## 3.6 Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini ditampilkan dalam bentuk diagram pada Gambar 3.2. Penelitian ini dimulai dengan tahap persiapan, dilanjutkan dengan pelaksanaan penelitian di laboratorium, kemudian tahap analisis *in silico*, dan diakhiri dengan penulisan laporan skripsi.



Gambar 3.2 Alur Penelitian