

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian deskriptif merupakan jenis penelitian yang digunakan. Menurut Martyn (2008) penelitian deskriptif adalah salah satu metode ilmiah di mana dalam penelitian dilibatkan proses mengamati dan menggambarkan perilaku subjek tanpa mempengaruhi dengan cara apapun.

B. Objek Penelitian

DNA ikan gurame soang, dan set *primer degenerate* gen TYRP1 yang dirancang berdasarkan konsensus sikuen gen TYRP1 dari beberapa ikan sekerabat ikan gurame dari *infraclass Teleostei*

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga September 2015, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229, Bandung, 40154 Jawa Barat – Indonesia.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan terdapat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229, Bandung, 40154 Jawa Barat – Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan terlampir dalam lampiran I.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap persiapan

Dilakukan sterilisasi panas lembab untuk alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian pada *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 15-20 menit. Guna kepentingan isolasi DNA, bahan-bahan disimpan dalam suhu 4 °C, -20 °C, dan suhu ruang sesuai kriteria masing-masing bahan. Sterilisasi diperlukan guna menjaga kondisi alat atau bahan yang akan digunakan dari kontaminasi mikroorganisme seperti spora, jamur, bakteri, dan lainnya. Menurut lembaga kesehatan dunia atau World Health Organization (2014), suhu sterilisasi yang optimum yaitu pada rentang 121-124 °C selama 15 menit.

2. Tahap prapenelitian

a. Perancangan *primer degenerate* gen TYRP1

Perancangan primer diawali dengan pengumpulan sikuen gen TYRP1 dari ikan sekerabat ikan gurame dari *infraclass Teleostei*, sikuen di dapat dari laman *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer di rancang sebanyak dua pasang yaitu satu pasang *outer-primer* dan satu pasang *inner-primer (nested)*. Perancangan *inner-primer* mengacu pada bagian sikuen yang lebih dalam dari sikuen *outer-primer* dengan jarak basa minimal 10 pb. Sikuen yang di pilih berasal dari daerah *coding DNA sequence* (CDS) di mana CDS merupakan bagian dari sikuen DNA yang tersusun atas *exon* dan mengodekan protein tertentu (Twyman, 2003). Keseluruhan sikuen yang di dapat kemudian di *copy* kan untuk di buat dalam format *FASTA* dengan ekstensi file *.txt*. Dalam file format *FASTA*, keberadaan spasi tidak di perbolehkan dan di ganti dengan simbol *underscore* “_” (tanpa tanda kutip). Label identitas (secara singkat, dan informatif) dicantumkan pada bagian atas sikuen guna menandai suatu sikuen dengan sikuen lainnya. Hal tersebut berlaku untuk setiap sikuen.

Kemudian dilakukan pensejajaran sikuen atau *Multiple Alignment* dengan software ClustalX 1.83. Pensejajaran sikuen dilakukan guna mensejajarkan basa-basa DNA yang berasal dari berbagai organisme menjadi suatu sajian sikuen yang baik dan utuh guna mengidentifikasi kesamaan konsensus antar hubungan fungsional, struktural, atau

evolusi antar sikuen (Mount, 2004). Dalam software clustalX 1.83 file format FASTA diunggah dengan mengklik tab '*file – load sequences*'. Setelah file di unggah dalam *software*, tampilan clustalX 1.83 akan menunjukkan beragam sikuen yang telah di *submit*. Kemudian, pada tab '*Alignment*' menu pilihan '*Output Format Options*' dipilih untuk menentukan format output file yang diinginkan. Pada jendela pilihan '*Output Format Options*' kemudian dicentang kolom *CLUSTAL* format dan *NEXUS* format, setelah itu tab *CLOSE* diklik.

Setelah dipilih *output file* yang diinginkan, kemudian tab *alignment* di klik kembali, dan menu pilihan *Do Complete Alignment* di pilih untuk dilakukan proses *alignment*. Setelah muncul jendela baru *Do Complete Alignment*, kemudian tab *START* di pilih untuk memulai proses *alignment*. Proses *alignment* selesai bila di bagian bawah kiri jendela *software* clustalX 1.83 terdapat instruksi '*Alignment completed*'. Setelah proses selesai, keluar dari jendela *software* clustalX 1.83 dan file hasil *alignment* akan tersimpan secara otomatis.

Setelah dilakukan *alignment*, perancangan primer selanjutnya dilakukan secara *online* pada laman Primaclade (<http://primaclade.org/cgi-bin/primaclade.cgi>). Pada laman penuh Primaclade, pada bagian tab '*Browse..*' *file* hasil *alignment* dengan ekstensi file *.nxs* (NEXUS) di unggah pada laman Primaclade. Kemudian, pada tab '*Select your file format*' dipilih '*nexus*'. Selanjutnya pada tab '*Max Num of Degeneracies*' dipilih 2,3,4, hingga 5 dan pada bagian tab lain di isi secara *default*. Kemudian tab '*Submit*' di pilih untuk memulai proses perancangan primer secara digital. Proses perancangan primer selesai di tandai dengan tampilan jendela baru dari Primaclade, setelah itu link pada jendela baru Primaclade di klik untuk kemudian diarahkan secara otomatis ke laman kandidat primer hasil perancangan Primaclade.

Kandidat primer kemudian disajikan dengan berbagai keterangan pendukung perancangan primer yang baik. Pada pemilihan primer *forward*, dipilih bagian hulu atau atas dari keseluruhan kandidat yang tersaji, kemudian untuk primer *reverse* dipilih pada bagian hilir atau bawah dari keseluruhan kandidat yang tersaji. Pasangan primer yang memenuhi kriteria primer yang baik, kemudian dipilih untuk kemudian dilakukan tes keberadaan struktur sekunder secara *online* pada laman *Beacon Designer (free edition)*

(<http://www.premierbiosoft.com/qpcr/>). Tes struktur sekunder pada primer penting dilakukan karena turut mempengaruhi keberhasilan proses amplifikasi pada proses PCR. Pemilihan primer berdasarkan kriteria perancangan primer yang baik berdasarkan kriteria utama dan keberadaan struktur sekunder yang mengacu pada protokol pembuatan primer yang baik Premier Biosoft (2015).

3. Tahap penelitian

a. Isolasi DNA genom ikan gurame dengan metode *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB)

Metode Isolasi DNA dilakukan berdasarkan protokol Saghai-Marroof *et al.*,(1984); Rogers and Bendich (1985); Doyle and Doyle (1987) dalam Weising *et al.*,(1995) dengan beberapa modifikasi. Sampel DNA yang digunakan berasal dari isolasi DNA genom ikan gurame pada penelitian Kusumawaty (2014, pustaka tidak dipublikasikan). Sampel ikan gurame soang di dapat dari peternakan ikan Tasikmalaya, Jawa Barat. Isolasi DNA ikan gurame soang diawali dengan tahapan ekstraksi, di mana bagian organ ginjal, hati atau daging ikan gurame soang dihancurkan terlebih dahulu dengan mortar steril hingga halus kemudian sebanyak 100-250 µl isolat dimasukkan kedalam tabung tabung mikro 1,5 ml. Setelah itu, sebanyak 500 µl *buffer lisis Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) 2X ditambahkan kedalam tabung isolat, kemudian *Sodium Deodecy Sulfat* (SDS) 20 % turut ditambahkan sebanyak 7 µl. Tabung isolat kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balikan secara perlahan. Tabung yang berisi campuran isolat selanjutnya diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65 °C selama satu jam. Kemudian tabung isolat diangkat dan ditambahkan *Proteinase K* sebanyak 10 µl, dan dihomogenkan. Tabung kemudian diinkubasi kembali dalam *waterbath* selama dua jam pada suhu 65 °C. Kemudian *Proteinase K* ditambahkan kembali pada tabung isolat sebanyak 5 µl untuk selanjutnya diinkubasi kembali dalam *waterbath* selama 24 jam pada suhu 65 °C.

Setelah waktu inkubasi selama 24 jam, tabung isolat kemudian di angkat dari *waterbath* dan ditambahkan *Potasium Asetat* 5 M sebanyak 1/10 (satu persepuluh) dari volume total, selanjutnya tabung di inkubasi pada suhu -20 °C selama 20 menit. Setelah

20 menit, tabung dikeluarkan dari *freezer* -20 °C untuk selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 15,000 rpm selama 10 menit. Pada tabung isolat hasil sentrifugasi, terbentuk dua fasa yaitu *supernatan* untuk fasa atas dan *pelete* untuk fasa bawah. *Supernatan* yang terdapat dalam tabung isolat dipindahkan pada tabung tabung mikro 1,5 ml baru, dan ditambahkan enzim *RNAse* (*DNAse free*) sebanyak 1/100 (satu perseratus) dari volume total. Tabung campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Setelah inkubasi, tabung ditambahkan *Chloroform Isoamil Alcohol* (CIAA) (24:1) sebanyak ½ (satu perdua) dari volume total dan dihomogenkan. Tabung isolat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15,000 rpm selama 10 menit. Fasa *supernatan* kemudian dipindahkan pada tabung tabung mikro 1,5 ml baru untuk kemudian ditambahkan *Sodium Asetat* 3 M sebanyak 1/10 (satu persepuluh) dari volume total, dan dihomogenkan dengan cara membulak-balikan tabung secara perlahan sebanyak 50X. Tabung kemudian ditambahkan *Etanol Absolut* sebanyak 2X volume total. Setelah itu tabung diinkubasi selama 24 jam atau *overnight* dalam *freezer* bersuhu -20 °C.

Dihari berikutnya, tabung dikeluarkan dalam *freezer* -20 °C untuk kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 15,000 rpm. Fasa *supernatan* yang terbentuk kemudian di buang secara cepat dan ditambahkan alkohol 70 % sebagai larutan aseptik sebanyak 100 µl dan dibuang kembali secara cepat untuk kemudian tabung disimpan terbalik dengan posisi mulut tabung berada dibawah atau berada pada alas yang telah disediakan. Setelah tabung dipastikan kering atau tidak dominan berbau alkohol, kemudian ditambahkan *Tris EDTA* (TE) dingin sebanyak 30–50 µl dan dihomogenkan dengan cara menjetikan perlahan tabung isolat. Tabung kemudian diinkubasi selama 15 menit dalam suhu 37 °C untuk kemudian disimpan dalam *freezer* pada suhu -20 °C.

b. Uji kualitatif dan kuantitatif isolat DNA genom ikan gurame

Uji kualitatif dan kuantitatif dilakukan untuk sampel hasil isolasi. Dilakukan uji kualitatif berupa *electrophoresis gel agarose* untuk mengetahui kualitas DNA isolat, dan dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA isolat dengan *UV-Spectrophotometer*.

Uji kualitatif dilakukan dengan *electrophoresis gel agarose* untuk mengetahui kualitas DNA dengan membaca larik pita DNA yang dihasilkan. Sebanyak 0,3 g *gel agarose* dilarutkan dalam 30 ml *TAE 1X* untuk didapatkan konsentrasi agar sebesar 1 %. Kemudian agar dilarutkan dengan bantuan *microwave* hingga bening. Larutan agar kemudian didiamkan hingga suhu larutan hangat, tidak terlalu panas dan tidak dingin untuk kemudian dicetak dalam cetakan agar khusus dalam sckkat *electrophoresis* untuk dibentuk sumur agar. Setelah itu, agar didiamkan dalam suhu kamar hingga tekstur agar padat, kemudian agar di simpan dalam alat *electrophoresis* dan ditambahkan *TAE 1X* hingga agar terendam. Sampel siap dimasukkan kedalam sumur-sumur yang tersedia sebanyak 1–5 µl. Kemudian *running electrophoresis* dimulai dengan menyetel alat pada *voltase* 100 V selama 40 menit, setelah selesai, agar dimasukkan dalam larutan *Etidium Bromida* (EtBr) guna proses pewarnaan DNA selama tiga menit dan dipindahkan kedalam *aquades* atau *deion* (ddH₂O) selama 7-15 menit. Agar kemudian dipindahkan pada alat *UV-Transiluminator* untuk proses pembacaan hasil uji kualitatif DNA.

Uji kuantitatif dilakukan guna mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA sampel dengan mengukur *absorbansi* DNA pada alat *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 260 nm guna konsentrasi DNA, dan perhitungan rasio *absorbansi* panjang gelombang 260 nm dan 280 nm untuk mengetahui kemurnian DNA (*DNA purity*). Pertama dilakukan pengukuran larutan *blanco* berupa ddH₂O sebanyak 500 µl pada *cuvet*. Setelah itu, larutan *blanco* dibuang dan *cuvet* dibilas dengan alkohol 70 %, kemudian *cuvet* dibilas kembali dengan ddH₂O untuk selanjutnya siap digunakan untuk pengukuran sampel. Guna pengukuran sampel, dilakukan pengenceran 500X dengan mencampurkan sampel sebanyak 1 µl dan ddH₂O sebanyak 499 µl kedalam tabung tabung mikro 1,5 ml. Tabung campuran kemudian di *vortex* terlebih dahulu kemudian di *sentrifugasi* selama 5 detik. Sampel kemudian dipindahkan kedalam *cuvet* , sebelum di lakukan *running spectrophotometer* seluruh bagian dinding luar tabung *cuvet* dibersihkan terlebih dahulu menggunakan kertas lensa. Hasil pengukuran ditampilkan dalam layar alat *spectrophotometer* berupa hasil *absorbansi* pada panjang gelombang 260 nm, 280 nm, dan kemurnian DNA.

c. Amplifikasi gen TYRP1 pada DNA genom ikan gurame menggunakan primer degenerate dengan metode nPCR

Amplifikasi gen TYRP1 pada DNA genom ikan gurame dilakukan dengan menggunakan dua pasang *primer degenerate*, yaitu *outer-primer* dan *inner-primer* pada stok DNA genom ikan gurame soang. Total reaksi yang digunakan sebanyak 10 µl dengan komposisi master mix sebagai berikut : 5 µl *Dream Taq Green PCR Master Mix 2X*, 0,5 µl *Mix DNA* atau *DNA Template* (0,5 µg/ul), 1 µl *Primer Forward* (1 µM), 1 µl *Primer Reverse* (1 µM), dan 2,5 µl ddH₂O. Amplifikasi dilakukan dengan bantuan alat *Thermocycler* yang di setel dengan beberapa pengaturan untuk melaksanakan beberapa kondisi. Program PCR yang digunakan berdasarkan protokol Thermo Scientific (2014) dengan beberapa modifikasi.

Proses amplifikasi berlangsung sebanyak 35 siklus dan diawali dengan tahapan *initial denaturation* pada suhu 95 °C selama tiga menit, kemudian diikuti dengan proses *denaturation* pada suhu 95 °C selama 30 detik, kemudian proses *annealing* atau penempelan primer pada siklus gen target selama 30 detik pada *temperature melting* (T_m) atau suhu sesuai kondisi spesifik masing-masing primer. Selanjutnya proses *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit per *kilobytes*. Pada tahap *extension* waktu yang digunakan bervariasi tergantung ukuran ampikon dari gen target dengan perhitungan waktu 60 detik untuk ukuran ampikon 1000 pb. Kemudian dilanjutkan pada proses *final extension* selama 7 menit pada suhu 72 °C, dan tahapan terakhir yaitu *holding* pada suhu 16 °C. Dilakukan optimasi suhu *annealing* pada program PCR guna mendapatkan hasil amplifikasi terbaik. Pada sampel dengan *inner-primer* digunakan *DNA template* hasil *running* PCR dengan *outer-primer* sebanyak 1 – 0,5 µl dengan pengenceran 1/25 (satu perduapuluhlima) menggunakan ddH₂O.

Untuk mengetahui fragmen DNA hasil PCR dilakukan *electroforesis gel agarose* dengan konsentrasi agar 1 % dalam total volume 30 ml. *Electroforesis* dilakukan selama 40 menit dan tegangan 100 V. Hasil kemudian diwarnai dalam larutan *Etidium Bromida* (EtBr) selama tiga menit, dan di bilas dengan aquades/deion selama 7-15 menit. Hasil kemudian diidentifikasi pada *UV-Transiluminator* dan didokumentasikan dengan kamera digital.

d. DNA sequencing gen TYRP1 ikan gurame dan analisa data

Setelah pita tunggal terbentuk kemudian di lakukan perbanyakkan sampel guna proses *sequencing*. Total volume setiap sampel berjumlah 50 µl dengan komposisi mix PCR sebagai berikut ; 25 µl *Dream Taq Green PCR Master Mix 2X*, 2,5 µl *Mix DNA* atau *DNA Template* (0,5 µg/ul), 5 µl *Primer Forward* (1 µM), 5 µl *Primer Reverse* (1 µM), dan 12,5 µl ddH₂O. Proses *sequencing* berlangsung di Seoul, Korea oleh pihak penyedia layanan jasa *sequencing* Macrogen Inc.

Analisis data hasil *sequencing* dilakukan dengan melakukan pengecekan sikuen pada laman <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/> untuk proses BLAST. Pengecekan dilakukan dengan mengunggah sikuen yang didapat dari proses *sequencing* pada laman NCBI dengan pilihan *Nucleotide Blast*.

e. Analisa sikuen gen TYRP1 ikan gurame

Sikuen yang di dapat dari hasil *sequencing* berjumlah empat sikuen, yang terdiri dari dua buah sikuen *forward* untuk primer dengan *outer-primer* dan *inner-primer* dan dua buah sikuens *reverse* untuk primer dengan *outer-primer* dan *inner-primer* . Selanjutnya, ke empat sikuen di analisa untuk didapatkan sikuen DNA genom gen TYRP1 ikan gurame. Pertama, di lakukan *multiple alignment* pada keempat sikuen yang di dapat. Kemudian setiap basa konsensus yang di dapat kemudian di analisa satu persatu dengan mengamati kecenderungan basa yang baik untuk di susun dalam sikuen DNA genom gurame (*Osphronemus gouramy*). Pemilihan basa-basa yang baik harus memiliki nilai dominan, dan memiliki nilai diagram yang baik yang dapat di lihat dari hasil *peak* pada hasil *sequencing*.

Setelah di susun satu persatu basa-basa konsensus hasil *alignment*, kemudian di buat dalam format FASTA dengan ekstensi file .txt. Kemudian sikuen yang berhasil di dapat hasil analisa satu persatu basa konsensusnya, dilakukan BLAST untuk merapihkan sikuen dengan *homologinya* agar didapat sikuen utuh DNA genom gurame dengan merapihkan sikuen. Proses merapihkan sikuen dilakukan dengan membuang

bagian hulu dan hilir dari keseluruhan sikuen berdasarkan homologi yang didapat pada saat proses BLAST.

Seberapa banyaknya bagian hulu dan hilir sikuen di buang dengan melihat kecenderungan nilai homologi sikuen hasil BLAST. Setelah di buang bagian hulu dan hilir sikuen, kemudian di dapat sikuen utuh DNA genom ikan gurame (*Osphronemus gouramy*). Sikuen DNA genom ikan gurame kemudian di analisa kembali untuk mengetahui daerah yang terkonservasi atas *exon* dan *intron*.

Dilakukan BLAST pada sikuen DNA genom ikan gurame yang telah di dapat dan di lakukan perbandingan daerah *intron* dan *exon* dengan sikuen *Takifugu rubripes*. Penentuan daerah *intron* dan *exon* dilakukan dengan mengamati kesamaan sikuen gurame dengan *Takifugu rubripes* (AF397401.1) pada tabel *subject* dan *query* yang terdapat dalam laman NCBI-BLAST.

f. Konstruksi pohon filogenetik gen TYRP1

Konstruksi pohon filogenetik gen TYRP1 di rancang berdasarkan sikuen nukleotida daerah *Coding DNA Sequence* (CDS) dan asam amino hasil *translate* sikuen nukleotida daerah CDS. Dilakukan konstruksi pohon filogenetik untuk mengetahui kekerabatan gen TYRP1 pada ikan gurame dengan ikan sekerabatnya. Digunakan total 16 sikuen dalam perancangan pohon filogenetik gen TYRP1 dengan didalamnya terdapat satu sikuen outgroup yaitu *Homo sapiens* (NM_000550.2 & NP_000541.1).

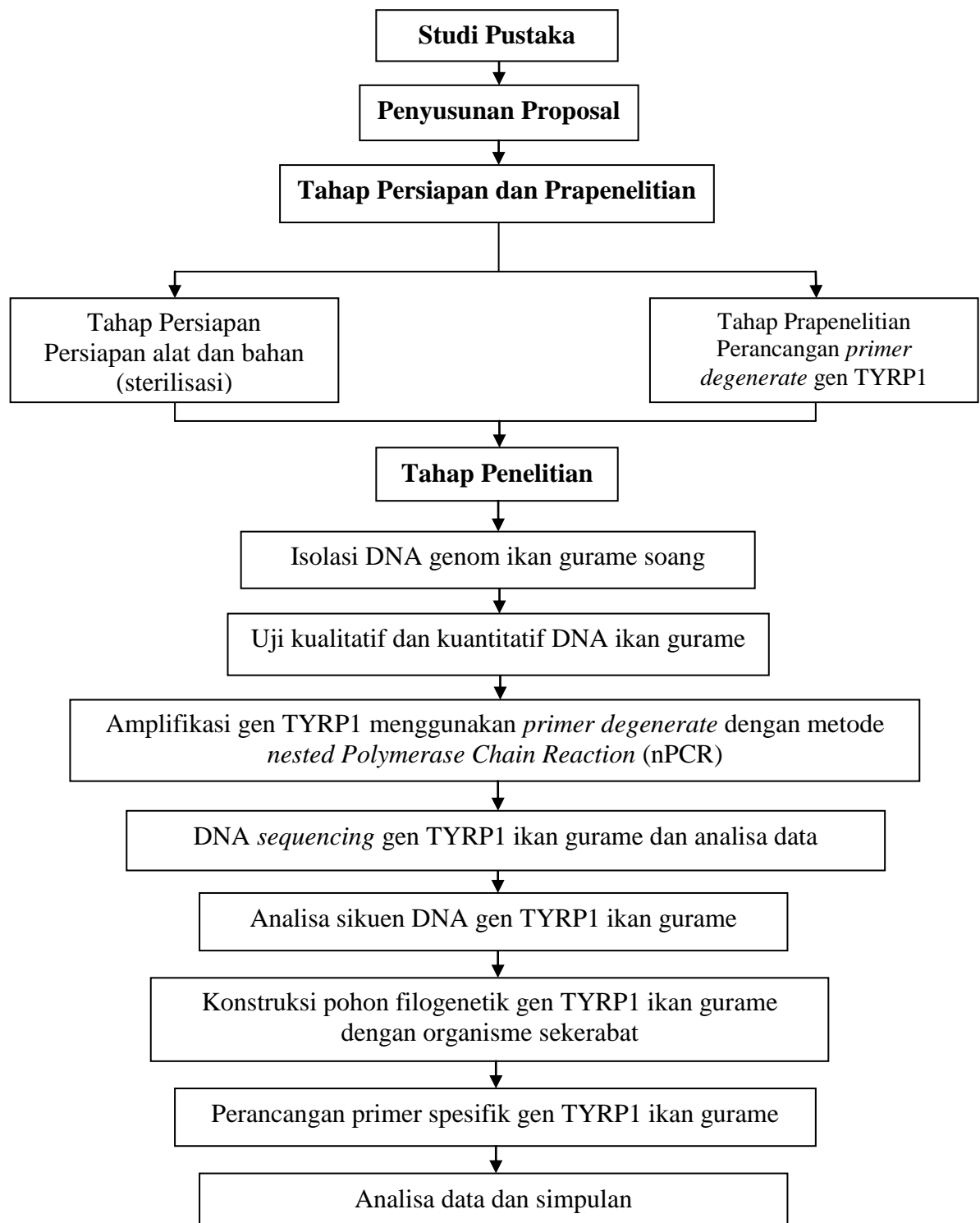
Konstruksi pohon filogenetik gen TYRP1 diawali dengan mengumpulkan keseluruhan sikuen gen TYRP1 dari laman *GenBank* (<http://ncbi.nih.nlm.gov>), kemudian sikuen di buat format FASTA dengan hanya mengambil daerah CDS pada setiap sikuen dan sikuen asam amino hasil *translate* daerah CDS. Dilakukan *alignment* dengan *software* clustalX.1.83, kemudian file *nexus* hasil *output* dari proses *alignment* di *convert* menjadi format MEGA dengan ekstensi file .meg dengan *software* MEGA4. File dengan ekstensi file .meg kemudian di unggah pada *software* MEGA4 dan pohon filogenetik di buat secara digital dengan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dan nilai *replication* 500. Pohon yang telah terbentuk kemudian dianalisa untuk mengetahui karakterisasi gen TYRP1 pada ikan gurame dengan organisme sekerabatnya.

g. Perancangan primer spesifik gen TYRP1 ikan gurame

Primer spesifik di rancang dari daerah CDS sikuen gen TYRP1 ikan gurame. Perancangan primer di lakukan secara *online* pada laman Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Pada laman Primer3 sikuen CDS gen TYRP1 ikan gurame di *submit* pada kotak dialog yang tersedia. Kemudian, pada kriteria primer yang tersedia pada laman Primer3 dibiarkan secara *default* kecuali pada tab *Primer Tm* di isi dengan nilai *Min.* 60 °C *Opt.* 63 °C dan *Max.* 65 °C untuk didapatkan pasangan primer yang memiliki nilai *Tm* yang diinginkan, yaitu nilai *Tm* diatas 60 °C.

Kemudian tab *Pick Primers* pada laman Primer3 di klik untuk dimulai perancangan primer secara otomatis, dan pada kotak dialog selanjutnya tersaji kandidat primer yang dapat di pilih. Primer di pilih dari yang terbaik dari keseluruhan kandidat yang ada. Ukuran ampikon dengan nilai maksimal 150 pb merupakan salah satu kriteria primer spesifik yang diharapkan.

F. Alur Penelitian



Bagan 3.1 Diagram alir penelitian