

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis Penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif karena pada penelitian ini tidak ada perlakuan khusus yang diberikan pada *Anguilla bicolor*. Penelitian deskriptif bertujuan untuk memberi gambaran atau deskripsi mengenai suatu situasi secara objektif (Luthfan, 2016).

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

Penelitian dilakukan selama empat bulan, yaitu dari bulan Februari hingga Mei 2019 di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Sementara untuk proses sikuensing sampel hasil amplifikasi DNA dilakukan di MacroGen Inc, Seoul Korea Selatan.

#### **3.3. Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, adapun daftar dari alat bahan yang digunakan terdapat pada Lampiran 1.

#### **3.4. Prosedur Penelitian**

##### **3.4.1. Tahap Persiapan**

Pada tahap persiapan alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian dilakukan sterilisasi panas menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama  $\pm$  60 menit. Adapun bahan yang diperlukan pada penelitian dibuat larutan stoknya sesuai dengan protokol (Lampiran 2).

### 3.4.2. Tahap Penelitian

#### 3.4.2.1. Studi Pendahuluan dan Pengumpulan Data Sikuen *Housekeeping Gene*

Pada tahap awal penelitian dilakukan studi pendahuluan mengenai *housekeeping gene* pada ikan, khususnya pada ikan yang sekerabat dengan ikan sidat (*Anguilla bicolor*), studi pendahuluan ini penting dalam menentukan kandidat *housekeeping gene* yang akan digunakan. Kandidat *housekeeping gene* yang dipilih pada penelitian ini yaitu, *18s Ribosomal RNA* (18S rRNA), *Beta Actin* (ACTB), *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1A) dan *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH).

Gen *18s Ribosomal RNA* (18S rRNA) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1A) merupakan gen yang paling stabil di seluruh sampel yang dianalisis (Politis *et al.*, 2017). Kedua gen tersebut telah banyak digunakan sebagai *housekeeping gene* diberbagai studi karena kestabilannya (Setiawan & Lokman, 2010). Sama halnya dengan Gen *18s Ribosomal RNA* (18S rRNA) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1A) Gen *Beta Actin* (ACTB) dan *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) juga merupakan gen yang paling stabil diekspresikan (McCurley & Callard, 2008) dan karena kestabilannya Gen *Beta Actin* (ACTB) dan *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) digunakan untuk normalisasi ekspresi gen *vitellogenin* (*vtg*) dan *sitokrom P450 1A* (*cyp1a*) pada hati dalam penelitian yang dilakukan oleh Filby & Tayler (2007). Berdasarkan hal tersebut maka gen *18s Ribosomal RNA* (18S rRNA), *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1A), *Beta Actin* (ACTB) dan *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) dipilih sebagai kandidat *housekeeping gene*.

Keempat kandidat *housekeeping gene* yang dipilih tersebut kemudian dicari sikuennya pada laman *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Setelah itu akan didapat beberapa sikuen dari beberapa kandidat *housekeeping gene* pada ikan yang sekerabat dengan *Anguilla* ditingkat class Actinopterygii. Sikuen yang didapat selanjutnya disimpan dalam format FASTA pada *software notepad*.

### 3.4.2.2. Perancangan Primer *Degenerate Housekeeping Gene*

Tahap awal untuk melakukan perancangan primer *degenerate* adalah pensejajaran sikuen (*alignment*). Data sekuen *housekeeping gene* yang telah disimpan dalam format FASTA disejajarkan dengan menggunakan *software clustalX*. Kemudian dilakukan perancangan primer secara *online* pada laman *Primaclade* (<http://primaclade.org>). Pada laman *Primaclade* tersebut akan terdapat beberapa kandidat primer yang tersedia. Jumlah kandidat primer yang dipilih untuk satu gen pada penelitian ini adalah sebanyak empat primer atau dua pasang primer. Satu pasang untuk primer *outer* dan satu pasang untuk primer *inner*.

Pada saat pemilihan kandidat primer terdapat beberapa kriteria yang diperhatikan agar primer yang dihasilkan dapat mengamplifikasi DNA target dengan baik, adapun kriteria desain primer pada penelitian ini mengacu pada pedoman Desain Premier Biosoft (2015). Kriteria tersebut diantaranya, yaitu:

- a) Panjang primer berukuran 18-22 bp.
- b) Memiliki *Melting Temperature* ( $T_m$ ) berkisar 52-58 °C dan tidak lebih dari 65 °C
- c)  $T_a$  (*Annealing Temperature*) primer tidak boleh terlalu tinggi karena akan menghasilkan produk PCR yang rendah serta dapat menghasilkan hibridasi
- d) Konten GC (*GC clamp*) berkisar dari 40% hingga 60%.
- e) Menghindari *hairpin*, dimana toleransi nilai  $\Delta G$  *hairpin* adalah -3 kkal/mol.
- f) Menghindari *self dimer* antara dua primer, dimana primer homolog dengan dirinya sendiri, akan tetapi secara umum *self dimer* dengan  $\Delta G$  -6 kkal/mol masih dapat ditoleransi.
- g) Toleransi nilai  $\Delta G$  optimal *cross dimer* adalah -6 kkal/ mol.
- h) Nilai GC clamp tidak boleh lebih dari 3.
- i) Menghindari pengulangan nukleotida secara berurutan  $\geq 4$  pengulangan.
- j) Jumlah maksimal *run* (pengulangan) yang diterima adalah 4 bp, misalnya AGCGGGGGATGGGG
- k) Menghindari *cross homology* untuk meningkatkan spesififikasi primer.

Primer yang terpilih kemudian dicek struktur sekundernya pada laman *Beacon Designer* (<http://www.premierbiosoft.com>). Pada laman ini akan terlihat nilai

*hairipin*, *self dimer*, *cross dimer*, *GC clamp* persentase GC, Tm (°C) dan panjang primer. Kemudian untuk memastikan kembali struktur sekunder yang terbentuk maka dilakukan pengecekan juga pada laman NCBI Primer-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer\\_blast/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer_blast/)). Pada laman ini akan terlihat panjang primer, Tm (°C), persentase GC, nilai *self complementarity* dan nilai *self 3'complenearity*. *Self complementarity* pada primer dan pasangan primer dapat menyebabkan struktur hairipin, yaitu struktur yang dibentuk dari basis pasang asam polynucleic antara urutan komplementer untai tunggal DNA atau RNA. Sementara *self 3'complenearity* dapat menyebabkan struktur dimer yaitu primer saling berikatan dengan primer lainnya. Toleransi dari nilai *self complementarity* dan nilai *self 3'complenearity* adalah 4 dan akan lebih baik bila nilai dari nilai *self complementarity* dan nilai *self 3'complenearity* adalah 0 (Sasmito *et al.*, 2014). Setelah didapat kandidat primer yang baik, untuk mengetahui primer tersebut homolog pada ikan class Actinopterygii terutama pada ikan yang sekerabat dengan ikan sidat (*Anguilla*) maka dilakukan BLAST pada laman Nucleotide BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)).

#### **3.4.2.3. Identifikasi Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*)**

Sampel ikan sidat untuk isolasi DNA pada penelitian ini berjumlah 1ekor karena apabila spesienya sama maka akan memiliki DNA yang sama juga. Dengan demikian 1 ekor saja sudah mewakili spesies yang diteliti. Spesies ikan sidat yang digunakan pada penelitian ini adalah spesies *Anguilla bicolor* yang dipesan dari tempat budidaya ikan sidat Tasikmalaya, Jawa Barat, dimana pada tempat budidaya tersebut hanya membudidayakan dua spesies yaitu *Anguilla bicolor* dan *Anguilla marmorata*. Namun untuk memastikan bahwa spesies ikan sidat yang diperoleh dari tempat budidaya adalah spesies *Anguilla bicolor* maka peneliti melakukan identifikasi secara morfologi. Kemudian membandingkannya dengan kunci determinasi yang mengacu pada pedoman Zoologi Vertebrata (Sudargo & Hernawati, 2017) untuk tingkat class, order dan family. Sementara pada tingkat spesies ciri morfologi dibandingkan dengan ciri yang ada pada penelitian Hakim *et al.* (2015).

Adapun kunci determinasi dan ciri morfologi untuk *Anguilla bicolor* secara rinci dapat dilihat pada Lampiran 3. Ikan sidat (*Anguilla bicolor*) yang digunakan pada penelitian ini merupakan ikan sidat dewasa yang berukuran  $\pm 40$ cm untuk memudahkan dalam proses pembedahan pada tahap selanjutnya.



Gambar 3. 1 Ikan sidat (*Anguilla bicolor*).  
a = Bagian ventral; b = Bagian Dorsal  
(Dokumentasi pribadi, 2019)

#### 3.4.2.4. Pembedahan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*)

Sampel ikan sidat (*Anguilla bicolor*) yang telah diidentifikasi dilakukan pembedahan kemudian diambil beberapa organ seperti ginjal, hati, jantung, pankreas, lambung, usus, dan diambil juga jaringan otot. Ketujuh organ selanjutnya disimpan dalam *tube falcon* berisi 1 ml larutan RNA *later*. Setelah itu ditempatkan pada suhu -4°C selama satu hari untuk menyesuaikan dan hari berikutnya disimpan pada suhu -20°C.

#### 3.4.2.5. Isolasi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan metode dari Sambrook protokol (Sambrook *et al.*, 1989; Ojeda *et al.*, 2012) dengan beberapa modifikasi. Penggunaan protokol Sambrook *et al.* (1989) dipilih karena pada penelitian yang dilakukan oleh Rahma (2018) terbukti keberhasilannya, dimana hasil isolasi dengan protokol Sambrook *et al.* (1989) menunjukkan hasil yang baik terlihat dari pita DNA yang terbentuk. Tahap isolasi DNA diawali dengan penimbangan sampel organ seberat 25 mg per masing-masing organ. Kemudian masing-masing sampel dimasukkan kedalam *tube eppendorf* berukuran 1,5 ml yang berisi 500  $\mu$ l buffer lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 1% SDS, dan 50 mM NaCl). Setelah itu sampel yang berada dalam *tube* dihaluskan menggunakan *micropestle* steril, lalu

disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang didapat dari hasil sentrifugasi dipindahkan pada *tube eppendorf* 1,5 ml baru sebanyak 500 µl serta ditambahkan juga 300 µl NaCl 5M. Sampel kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000rpm selama 15 menit. Setelah disentrifuge supernatan diambil kembali sebanyak 500 µl pada *tube eppendorf* 1,5 ml baru dan ditambahkan isopropanol dengan sebanyak volume yang sama dengan volume supernatan yang diambil. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* beberapa saat sampai sampel terlihat homogen. Selanjutnya sampel disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifugasi dibuang dengan hati-hati agar *pellet* tidak terbuang. *Pellet* DNA yang didapat kemudian dicuci dengan etanol 70% sebanyak 750 µl selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Etanol lalu dibuang secara perlahan dan tabung dari sampel disimpan dengan posisi terbalik diatas tisu steril sampai etanol yang tersisa di dinding tabung kering. *Pellet* DNA yang didapat selajutnya dilarutkan dengan TE buffer 1X sebanyak 50 µl dan disimpan pada suhu -20°C.

#### **3.4.2.6. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat DNA**

Uji kualitatif dan uji kuantitatif dilakukan setelah mendapat sampel DNA dari hasil isolasi DNA. Elektroforesis gel agaros digunakan untuk menguji kualitatif DNA dengan cara memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran dalam media padat berupa gel agaros. Penerepana arus listrik bermuatan negatif (anoda) di bagian ujung atas dan bermuatan positif (katoda) dibagian ujung bawah menyebabkan DNA yang bermuatan negatif bermigrasi menuju ujung bawah. Tingkat migrasi tersebut akan sebanding dengan ukuran fragmen DNA, dimana fragmen yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat (Carr, 2012). Selain ukuran dari molekul DNA tingkat kecepatan migrasi molekul DNA ditentukan oleh beberapa hal berikut: (a) Konsentrasi agaros; (b) Konformasi DNA; (c) Tegangan listrik; (d) Jenis agaros dan (e) Buffer elektroforesis (Lee *et al.*, 2012).

Pembuatan gel agaros diawali dengan menimbang serbuk agaros sebanyak 0,3 gr kemudian dimasukkan kedalam tabung *duran* yang berukuran 100 ml Setelah itu gel agaros ditambahkan 30 ml buffer TAE 1X., lalu dipanaskan menggunakan *microwave* sampai agaros larut dalam buffer TAE 1X, namun sebelum dipanaskan pastikan dahulu bahwa tutup botol *duran* dalam keadaan longgar. Menurut (Green & Sambrook, 2019) apabila setelah dipanaskan dalam jangka waktu tertentu masih belum larut, maka waktu pemanasan perlu diperpanjang sampai gel agaros benar-benar larut dan perhatikan juga volume larutannya, jangan sampai berkurang banyak akibat penguapan saat larutan mendidih.

Gel agaros selanjutnya didiamkan dahulu sampai hangat kuku, sambil menunggu gel agaros hangat kuku siapkan cetakan gel agaros beserta sisirnya. Pastikan juga bahwa sisir yang dipasang tidak miring. Ketika gel agaros sudah hangat kuku selanjutnya ditambahkan pewarna PeqGreen 1  $\mu$ l kemudian botol digoyangkan agar PeqGreen larut. Setelah itu gel agaros dituangkan pada cetakan yang telah disiapkan dan dibiarkan sampai mengeras. Gel agaros yang sudah mengeras selanjutnya dimasukkan kedalam alat elektroforesis dan ditambah buffer TAE 1x hingga gel agaros terendam. Pada sumur pertama dimasukan *ladder* sebanyak 1  $\mu$ l dan pada sumur selanjutnya dimasukan isolat DNA sebanyak 2  $\mu$ l yang sebelumnya telah di mix dengan loading day 6x sebanyak 1  $\mu$ l. Menurut Lee *et al.* (2012) Loading dye 6x membantu dalam melacak seberapa jauh isolat DNA telah bermigrasi dimana ketika isolat DNA telah bermigrasi akan ada 3 warna yang muncul pada gel agaros yaitu ungu, biru dan kuning. Setelah *ladder* dan isolat DNA telah selesai dimasukkan kedalam sumur selanjutnya alat elektroforesis di set pada voltase 100 volt dengan waktu 30 menit kemudian tekan tombol *on* untuk *running* elektroforesis. Apabila *running* telah selesai selanjutnya gel agaros diletakan pada *UV-Transiluminator* untuk melihat fragmen DNA yang terbentuk. Menurut Green & Sambrook (2019) DNA yang telah dipisahkan melalui gel agaros dapat dideteksi dengan pewarna. Pita DNA yang diwarnai dengan pewarna akan divisualisasikan dengan menyinari gel agaros dengan Sinar UV.

Sementara itu untuk uji kuantitatif digunakan alat spektrofotometri yaitu *Genesys 10uv Scanning (Thermo Scientific)*. Pada alat ini akan didapat nilai kemurnian dan konsentrasi dari isolat DNA yang digunakan. Menurut Trumbo *et al.* (2013) analisis spektrofotometri sangat penting untuk menentukan konsentrasi biomolekul suatu larutan yang digunakan dan telah biasa digunakan untuk menentukan konsentrasi DNA, RNA atau protein.

Menurut Fatchiyah *et al.* (2011) untuk melakukan uji kuantitas DNA, hasil isolat DNA diencerkan dahulu 100x dengan cara menambahkan 5 µl sampel DNA dan 495 µl ddH<sub>2</sub>O. Kemudian hasil pengenceran tersebut dimasukkan kedalam kuvet sebanyak 500 µL lalu kuvet tersebut dimasukkan kedalam spektrofotometri UV-Vis dengan menggunakan nilai absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi dan kemurnian DNA dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{\text{Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm}}{\text{Absorbansi pada panjang gelombang 280 nm}}$$

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

Å260 = Nilai absorbansi pada Å260 nm

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 µg untai ganda DNA per ml.

#### **3.4.2.7. Amplifikasi *Housekeeping Gene* Menggunakan Primer *Degenerate* dengan Metode *Nested PCR* (nPCR)**

Hasil isolat DNA diamplifikasi dengan menggunakan alat *GeneAmp PCR System 9700* dan *Eppendorf Mastercycler Personal*. Pada tahap awal proses amplifikasi disiapkan komposisi *mix* PCR dengan total reaksi 10 µl, adapun komposisi *mix* PCR yang digunakan mengacu pada penelitian Rahma (2018). Komposisi Mix PCR terdiri dari 0,5 µl primer *forward*, 0,5 µl primer *reverse*, 1 µl *mix* DNA atau DNA *template* (1 µg/ul), 3 µl *Nuclease Free Water* dan 5 µl enzim GoTaq Green PCR Master Mix 2X. Semua komposisi *mix* PCR dimasukkan kedalam *tube* PCR kemudian disimpan dalam alat PCR yang telah diatur programnya

Pada teknik PCR terdapat tiga langkah utama yang terlibat di dalamnya, yaitu *denaturation*, *annealing* dan *extension* (Joshi & Deshpande, 2010). Metode



PCR yang digunakan adalah *Nested* PCR dengan menggunakan dua set primer *degenerate* (*outer* dan *inner*) yang telah dirancang sebelumnya dan program PCR *thermocycler* yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada protokol *GoTaq Green Master Mix 2x* dengan beberapa modifikasi pada suhu  $T_a$  serta waktu yang digunakan pada siklus *denaturation* dan *extension*. Pada tahap *denaturation* suhu yang digunakan adalah  $95^{\circ}\text{C}$ , dengan waktu *denaturation* awal 3 menit dan *denaturation* akhir 30 detik. Sementara itu suhu pada tahap *annealing* ditentukan dengan cara melakukan optimasi suhu sesuai dengan primer yang digunakan untuk mendapat hasil amplifikasi optimal. Waktu yang digunakan pada tahap *annealing* adalah 30 detik dan pada tahap *extension* suhu yang digunakan adalah  $72^{\circ}\text{C}$  dengan waktu 1 menit pada tahap *extension* awal dan 10 menit pada tahap *extension* akhir. Kemudian dilakukan *holding* pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  (Promega, 2016; Rahma, 2018). Saat melakukan optimasi suhu pada penelitian ini juga dilakukan metode *touchdown* PCR yang mengacu pada GeneAmp® PCR System 9700 *Base Module* Biosystem (2010), dimana metode *touchdown* secara bertahap menurunkan suhu *annealing* dalam siklus awal untuk memaksimalkan hasil produk tertentu. Selanjutnya pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis gel agarosa dan spektrofotometri.

Apabila pita spesifik pada hasil PCR dengan menggunakan primer *outer* belum muncul maka dilakukan PCR ulang dengan cara menjadikan hasil PCR sebelumnya sebagai *template* DNA. Sebanyak  $1\ \mu\text{l}$  hasil PCR sebelumnya diencerkan 25X dengan menambahkan ddH<sub>2</sub>O. Selanjutnya *template* DNA tersebut di PCR kembali menggunakan primer *inner*. Ketika pita spesifik didapat selanjutnya dilakukan perbanyakkan untuk proses sikuensing (Kusumawaty, 2015; Rahma, 2018)

#### **3.4.2.8. Sikuensing DNA**

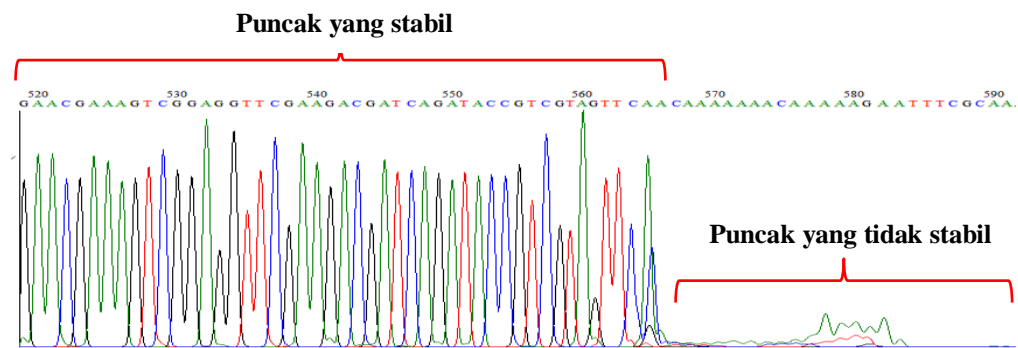
Sikuensing dilakukan dengan menggunakan mesin *sequencer* di Macrogen, Inc. Korea Selatan. Bahan yang harus disiapkan pada tahap *sequencing* adalah Sampel *housekeeping gene* ikan sidat (*Anguilla bicolor*) hasil amplifikasi PCR sebanyak  $50\ \mu\text{l}$  serta primer *forward* dan *reverse* masing masing sebanyak  $10\ \mu\text{l}$ .

Semua bahan disimpan dalam tabung 0.5 ml. Adapun sebelum mengirim sampel dilakukan dahulu pengisian *form* yang telah disediakan oleh pihak Macrogen, Inc. Korea Selatan. Setelah mengisi *form* tersebut akan didapat kode registrasi. Kode registrasi tersebut dicetak dan dikirim bersamaan dengan bahan yang telah disiapkan.

### 3.4.3. Tahap Analisa Data

#### 3.4.3.1. *Contig*

Analisis *contig* sikuen DNA genom ikan sidat (*Anguilla bicolor*) dilakukan pada *software Bioedit*. Urutan sekuen primer *forward* dan *reverse* dalam *file* dengan *extensi* ab1 yang didapat dari hasil sikuensing dibuka untuk melihat puncak yang terbentuk dari sikuen yang didapat. Hasil puncak yang tidak stabil (Gambar 3.1) dipotong pada bagian hulu dan hilirnya. Sikuen primer *forward* dan *reverse* yang sudah dipotong selanjutnya digabungkan dengan mengklik *Accessory Application* kemudian pilih *CAP Contig Assembly program*. Hasil *contig* yang didapat disimpan dalam format FASTA. Menurut Stubbs (2001) *contig* digunakan untuk menggambarkan sekumpulan rangkaian DNA yang tumpang tindih. Sebuah *contig* dapat dibangun dari dua set data sikuen. Sementara itu menurut Saraswathy dan Ramalingam (2011) *contig* merupakan langkah penting dalam perakitan genom.



Gambar 3. 2 Hasil sikuensing sebagian fragmen DNA primer *forward* 18S *Ribosomal RNA* (18S rRNA)

#### 3.4.3.2. BLAST

Urutan sikuen primer *forward* dan *reverse* hasil *contig* di BLAST pada laman NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan mengunggah *file* hasil

*contig* yang didapat dalam format FASTA. Pada hasil BLAST akan didapat sikuensikuen yang homolog dengan urutan sikuensikuen DNA genom ikan sidat (*Anguilla bicolor*) hasil *contig*.

#### **3.4.3.3. Konstruksi Dendrogram *Housekeeping Gene* Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*)**

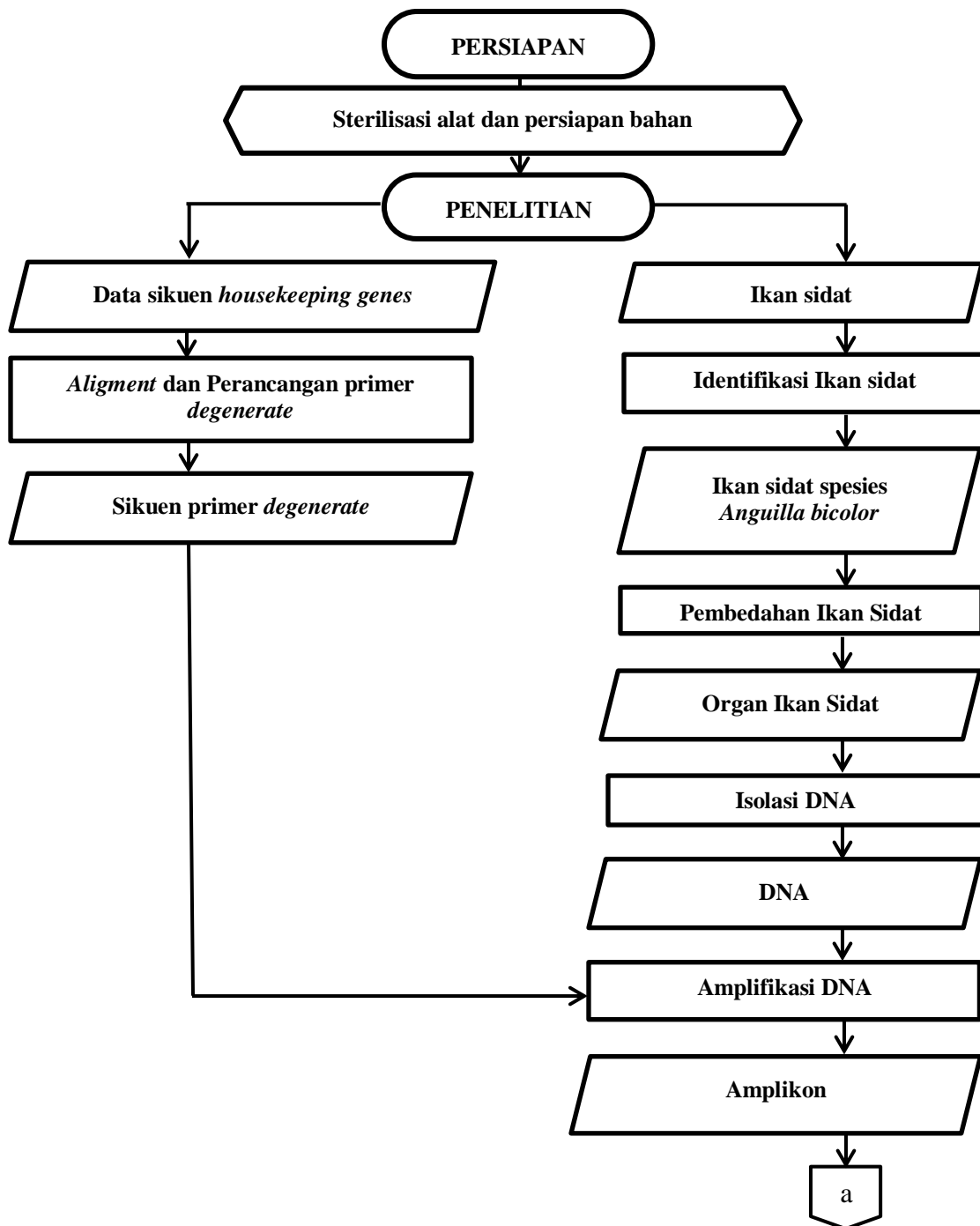
Konstruksi dendrogram yang dibuat pada penelitian ini menggunakan perangkat lunak Parsimony (PAUP) V.40. Penggunaan perangkat lunak tersebut sesuai dengan penelitian Scarcelli *et al.*, (2005) yang melakukan analisis kluster berdasarkan perbandingan sikuensikuen gen *flaA VI* DNA. Adapun untuk penggunaan perangkat lunak PAUP pada penelitian ini mengacu pada protokol PAUP berbasis window (Hidayat, t.t.). Tahap awal untuk melakukan konstruksi dendrogram adalah pengumpulan sikuensikuen *housekeeping gene* dari beberapa spesies ikan yang satu class dengan ikan sidat (*Anguilla bicolor*) kemudian digabungkan dengan sikuensikuen *housekeeping gene* yang didapat dari hasil sikuensing. Sikuensikuen yang sudah digabungkan selanjutnya disimpan dalam format FASTA dan disejajarkan dengan menggunakan *software ClustalX*.

Sikuensikuen yang telah dialign dengan menggunakan program PAUP\*4.0b10. Kemudian dianalisis *bootstrapping* 1000 kali ulangan untuk memperkirakan derajat kepercayaan dari masing-masing kelompok (klad) yang terbentuk. Dendrogram yang terbentuk disimpan, dan dilihat konstruksi yang terbentuknya menggunakan program *treev32*.

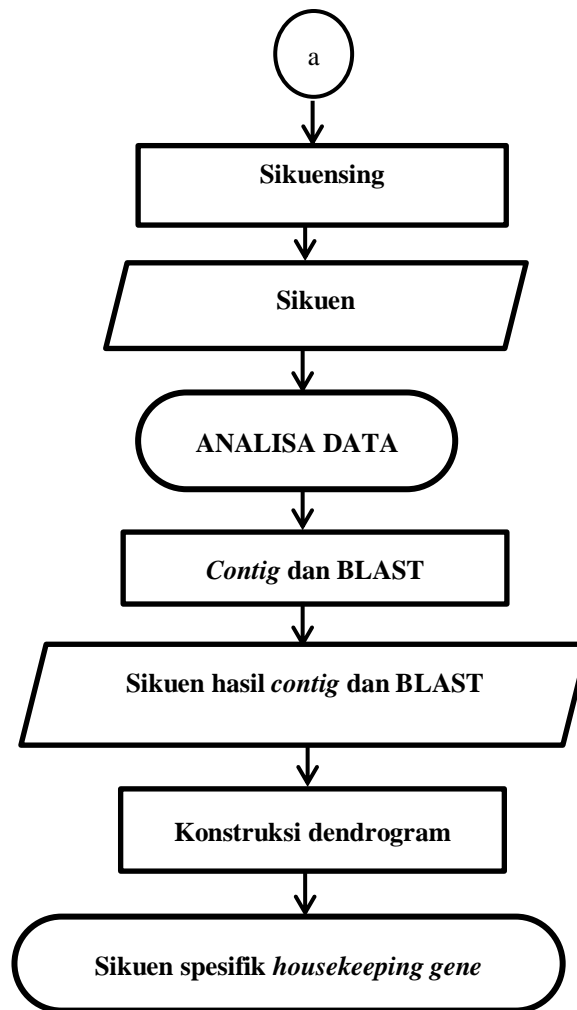
### **3.5. Alur Penelitian**

Secara garis besar tahapan pada penelitian terbagi menjadi tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap analisa data. Pada tahap persiapan dilakukan sterilisasi alat dan pembuatan larutan stok. Sementara itu pada tahap penelitian dilakukan perancangan primer *degenerate*, identifikasi ikan sidat (*Anguilla bicolor*), Pembedahan ikan sidat (*Anguilla bicolor*) dan isolasi DNA untuk mendapatkan isolat DNA. Kemudian Isolat DNA diamplifikasi menggunakan primer *degenerate* yang telah dirancang. Hasil amplifikasi selanjutnya di sikuensing

menggunakan menggunakan mesin *sequencer* di Macrogen, Inc. Korea Selatan. Tahap terakhir adalah tahap analisis data, dimana hasil sikuensing di analisis *contig* dan BLAST. Kemudian diidentifikasi dengan menggunakan dendrogram. Adapun keseluruhan tahapan pada penelitian yang telah diuraikan tersebut ditunjukkan oleh Gambar 3.3.A dan Gambar 3.3.B.



Gambar 3. 3.A Bagan alur penelitian



Gambar 3.3.B Bagan alur penelitian