

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimen. Menurut Jaedun (2011) penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian treatment/perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati/diukur dampaknya (data yang akan datang).

#### **3.2 Desain Penelitian**

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah Purposive sampling, dimana perlakuan diberikan secara acak kepada seluruh unit percobaan. Hal ini dapat dilakukan karena lingkungan tempat percobaan diadakan relatif homogen sehingga media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati (Kusuma, 2013)

#### **3.3 Populasi dan Sampel**

Pada penelitian ini populasinya adalah ikan gurame strain soang yang berasal dari peternakan daerah Tasikmalaya. Sampel penelitian adalah ikan gurame strain soang yang berukuran korek yaitu ukuran 3-4 cm dengan umur 2 bulan. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan warna kulit, kadar glukosa darah ikan, dan ekspresi *housekeeping* gen pada ikan gurame yang sudah diberikan perlakuan dengan pemberian suplemen *Spirulina plantesis* yang berbeda konsentrasi untuk melihat perbandingan ketahanan tubuhnya dengan memberikan stres suhu rendah 20°C.

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING* PADA  
IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*) YANG DIBERI  
STRES SUHU RENDAH 20°C PASCA PEMBERIAN  
SUPLEMEN *Spirulina plantesis***

Universitas Pendidikan Indonesia | [repository.upi.edu](http://repository.upi.edu) |  
[perpustakaan.upi.edu](http://perpustakaan.upi.edu)

### **3.4 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Februari 2018 sampai dengan September 2018 yang bertempat di Laboratorium Riset Bioteknologi dan Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*) YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina plantesis***

Universitas Pendidikan Indonesia | [repository.upi.edu](http://repository.upi.edu) | [perpustakaan.upi.edu](http://perpustakaan.upi.edu)



### **3.5 Alat dan Bahan**

Pada penelitian ini membutuhkan alat dan bahan untuk menyelesaikan proses pemeliharaan ikan, pembedahan, isolasi RNA, sintesis cDNA, menghitung konsentrasi DNA dan elektroforesis gel agarose. Alat dan bahan tersedia di laboratorium Riset Bioteknologi dan Riset Lingkungan namun ada beberapa yang tidak tersedia. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum pada Lampiran 1.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Persiapan Pelaksanaan**

##### **3.6.1.1 Persiapan air dan wadah**

Akuarium dengan ukuran  $p=45$  cm x  $t=25$  cm x  $l=23$  cm sejumlah sebanyak dua buah, ukuran aquarium  $p=30$  cm x  $t= 24$  cm x  $l = 18$  cm sejumlah dua buah, ukuran  $p=58$  cm x  $l=18$  cm x  $t=22$  cm sejumlah tiga buah, yang digunakan untuk ikan gurame pada tahap aklimatisasi dan dilengkapi batu aerasi, aerator dan selang disiapkan sebanyak 3 akuarium. Sebelum digunakan untuk perlakuan, akuarium disterilisasi terlebih dahulu menggunakan larutan hipoklorit dan didiamkan selama 24 jam, kemudian dicuci bersih dan dijemur di bawah terik matahari dengan tujuan untuk mematikan mikroorganisme di dalamnya. Setelah bersih akuarium diisi dengan air sumur yg telah diuji dengan menggunakan test kit air. Kelebihan penggunaan tes kit memerlukan waktu yang lebih efisien namun nilai yang tertera kurang akurat dan hanya menyamakan dengan warna yang ada pada alat tersebut kemudian di aerasi terlebih dahulu minimal selama 24 jam sebelum digunakan.

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***

**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina***

*plantesis*

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Persiapan alat – alat yang digunakan untuk tahapan isolasi RNA dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan, selanjunya semua alat seperti botol – botol dan alat bedah direndam dalam air DEPC selama 24 jam, kemudian di keringkan di dalam oven. Selanjutnya dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas kemudian disterilkan menggunakan uap panas dengan suhu 121°C selama 40 menit bersamaan dengan tips (putih, kuning, biru) , tabung, tisu, dan peralatan lainnya yang akan digunakan untuk tahapan isolasi RNA.

### 3.6.1.2 Aklimatisasi Ikan

Aklimatisasi ikan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ikan gurame yang berasal dari daerah Tasikmalaya dengan umur 2 bulan. Panjang rata-rata ikan 3 - 4 cm dengan berat kisaran 1- 2 gram. Akuarium yang digunakan pada tahap aklimatisasi menggunakan akuarium yang berbeda ukuran karena keterbatasan alat, sehingga menggunakan ukuran jumlah ekor/liter dengan tujuan menyamakan jumlah ikan pada setiap akuarium karena perbedaan bentuk dan ukuran aquarium. Pada tahap aklimatisasi ini menggunakan metode Harir (2010) Pada setiap akuarium berisi 4 ekor/liter. Aquarium yang digunakan yaitu ukuran  $p=45\text{ cm} \times t=25\text{ cm} \times l=23\text{ cm}$  sejumlah sebanyak dua buah, ukuran aquarium  $p=30\text{ cm} \times t=24\text{ cm} \times l=18\text{ cm}$  sejumlah dua buah, ukuran  $p=58\text{ cm} \times t=18\text{ cm} \times l=22\text{ cm}$  sejumlah tiga buah. Pada masa aklimatisasi ikan tidak diberi perlakuan terlebih dahulu, ikan hanya diberi pakan pelet biasa dengan ukuran pelet 500 PF (diameter 0,5-1 mm) pada ikan yang akan diuji.

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***

**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina*  
*plantesis***

**Universitas Pendidikan Indonesia |**

**repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu**

### 3.6.1.3 Penentuan pakan

Dalam penelitian ini pakan yang digunakan yaitu pakan komersial yang diberi tambahan berupa mikroalga yaitu *Spirulina plantesis* berupa tepung dengan konsentrasi yang berbeda. Perbandingan untuk *Spirulina plantesis* dengan pakan yaitu 1%/kg. Konsentrasi pakan yaitu 0%, 1%, dan 3%, perbedaan konsentrasi ini dijadikan sebagai variabel bebas (Mahmoud, dkk. 2017). Jumlah pakan yang diberikan yaitu sebanyak 3% dari jumlah bobot tubuh ikan yang digunakan dalam penelitian ini. Pemberian pakan sebanyak 2 kali yaitu pagi dan sore selama 40 hari. Dengan cara menaburkan pakan pada aquarium kemudian dilihat bagaimana respon ikan selama 15 menit jika pakan tidak habis maka diangkat dengan tujuan tidak ada pakan yang tersisa yang menyebabkan aquarium menjadi kotor karena endapan dari pakan tersebut.

### 3.6.1.4 Pembuatan pakan

Pembuatan pakan dengan cara mencampurkan pelet komersial dan tepung *Spirulina plantesis* sesuai dengan dosis yang dibutuhkan. Bahan perekat yang digunakan yaitu CMC sebanyak 1% kemudian diberi air hangat dengan tujuan tepung *Spirulina plantesis* menempel pada pelet di masukkan kedalam oven selama 60 menit dengan suhu 65°C jangan sampai terlalu kering (Wulansari, dkk. 2017). Jumlah pakan yang diberikan yaitu sebanyak 3% dari berat badan tubuh ikan.

### 3.6.1.5 Penebaran ikan

Sebelum dilakukan penebaran pada setiap aquarium, ikan dipilih dari aquarium aklimatisasi yang benar-benar sehat bagus. Ikan dihitung berat awal kemudian di rata-ratakan dan panjang ikan

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***

**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina plantesis***

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

total diukur per individu dan dirata-ratakan. Ikan ditebar sebanyak 30 ekor setiap konsentrasi suplemen *Spirulina plantesis* dengan menggunakan metode (Harir, 2010) yaitu 4 ekor/liter dengan ukuran ikan  $\pm 6$  cm setiap akuarium dengan berat dan panjang yang hampir sama.

### 3.6.1.6 Pemeliharaan dan perawatan

Selama penelitian yang dilakukan untuk pemeliharaan yaitu dengan menjaga kestabilan kedalaman air yang berkurang karena terjadi penguapan, mengganti air 2 hari sekali dan mengambil kotoran ikan yang berada di dasar akuarium. Pengecekan kualitas air (pH, Cl, Nitrat, Nitrit) dengan menggunakan tes kit uji air eSHa Aqua Quick Test. Kualitas air dengan pH yang baik untuk pertumbuhan ikan bekisar 7,0 – 8,0, suhu di 28 – 30°C. Kadar nitrat maksimum yaitu 0,5 mg/l sedangkan nitrit mencapai 5 mg/l. Nilai 0,2 – 0,3 ppm pada klorin mampu mematikan ikan, air dijaga dengan kadar klorin tidak lebih dari 0,003 ppm.

## 3.7 Desain Eksperimen

Penelitian ini dilakukan pada ikan gurame soang diberi perlakuan dengan pemberian pakan pelet komersial yang dicampur *Spirulina plantesis* dengan konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 0%, 1%, dan 3% (Mahmoud, 2017). Perbedaan konsentrasi dalam hal ini dijadikan sebagai perlakuan yang berbeda, yaitu:

- 1) Pakan Kontrol (PK) : diberi pakan komersial
- 2) Pakan *Spirulina* (PS1) : diberi pakan komersial + *Spirulina plantesis* 1%

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING*  
PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)  
YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C  
PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina*  
*plantesis***

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

- 3) Pakan *Spirulina* (PS3) : diberi pakan komersial + *Spirulina plantesis* 3%

Setelah itu ikan di uji dengan beberapa uji yaitu:

### 3.7.1 Uji Pertumbuhan Ikan Gurame

Ikan gurame yang diberi perlakuan selama 40 hari dengan pakan pelet dicampur *Spirulina plantesis* dengan konsentrasi yang berbeda masing masing diukur Panjang tubuh ikan menggunakan penggaris dan berat menggunakan timbangan. Pengukuran pada ikan dilakukan di hari ke 0, hari ke 20, dan di akhir yakni hari ke 40 dengan pengukuran rata-rata sampel. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan rumus Effendi (1979). Pengukuran ini bertujuan untuk melihat perubahan dari pertumbuhan ikan gurame tersebut.

### 3.7.2 Pemberian Stres Menggunakan suhu rendah 20°C

Pada penelitian ini menggunakan suhu 20°C untuk uji tantang setelah diberi pakan *Spirulina plantesis* selama 40 hari. Penggunaan suhu rendah sebelumnya pernah penelitian menggunakan suhu rendah yaitu 9°C pada ikan gurame (Hastuti, 2004). Semua ikan dari setiap akuarium diambil dan dimasukkan ke dalam akuarium yang telah di setting dengan suhu 20°C. Ikan dimasukkan kedalam dan dibiarkan selama 5 menit. Selama 5 menit ikan diamati perilakunya dan perubahan warna kulit yang terjadi kepada ikan (Hastuti, 2004).

### 3.7.3 Analisis Kadar Glukosa Darah Gurame

Pengukuran glukosa darah dilakukan dengan menggunakan alat Gluco tes One Touch. Penggunaan kit pada penelitian ini lebih praktis karena hanya membutuhkan darah sedikit dibandingkan dengan metode konvensional yang membutuhkan darah yang

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***

**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina plantesis***

**Universitas Pendidikan Indonesia |**

**repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu**

banyak selain itu penggunaan kit hanya memerlukan waktu sebentar, seperti yang dilakukan oleh Soemardji (2004) penelitian tentang kadar gula pada mencit. Sampel darah ikan diambil menggunakan pipa kapiler dan diteteskan pada test strip glukosa yang telah dimasukkan pada glukometer sehingga terbaca hasil glucose darah yang terkandung. Pengukuran kadar gula ini dilakukan pada jam-jam ke 0, 2, 6 dan 24 pasca diuji di suhu 20°C (Hastuti, 2004).

### 3.7.4 Pembedahan Ikan

Pembedahan ikan dilakukan pada jam ke 0, 2, 6, 24 pasca diuji stresor di suhu 20°C. Pembedahan dilakukan dengan menggunakan alat bedah yaitu gunting, pisau bedah, pinset yang telah disterilkan sebelumnya. Organ yang diambil yaitu organ hati. Penggunaan organ hati untuk isolasi RNA dikarenakan dalam keadaan stres maka organ hati akan mempertahankan kadar glukosa darah melalui metabolisme glukosa (Piliang & Djodjosobagjo, 2000). Organ diambil dan dimasukkan kedalam tabung 1,5 ml yang berisi RNA later didalamnya. Komposisi RNA later yaitu Natrium asetat, Amonium sulfat, EDTA, dan deion steril. Setelah dimasukkan kedalam tube berisi RNA later kemudian disimpan di suhu 4°C selama 24 jam. Setelah itu dipindahkan ke *freezer* dengan suhu -20°C.

### 3.7.5 Optimasi Isolasi RNA

Pada tahap ini sampel yang akan digunakan yaitu organ hati yang telah disimpan dalam RNA later dalam suhu -20°C. Tahap isolasi RNA pada penelitian ini dilakukan dengan dua metode ada metode manual dan Kit. Ada kelebihan dan kekurangan dengan metode

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***

**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina***

*plantesis*

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

manual dan kit. Menggunakan metode manual yaitu trizol lebih hemat biaya namun waktu yang di gunakan lebih lama dibanding kan menggunakan kit.

Pada proses isolasi dengan menggunakan metode yang telah di modifikasi dari penelitian yang dilakukan oleh Mendez, dkk (2011), pertama organ yang telah disimpan dalam rna later di suhu -20°C diambil dan ditimbang menggunakan timbangan digital sebanyak 25 mg organ hati. Penimbangan sampel menggunakan alas aluminium steril setelah didapatkan sampel 25 mg organ dimasukkan kedalam tabung 2 ml yang berisi 250  $\mu$ l trizol. Sampel di hancurkan dan dihomogenkan selama 6 x 10 detik menggunakan alat *homogenizer* yang telah dibersihkan dengan akuades, pada saat penghancuran organ alat *homogenizer* diangkat setiap 10 detik sekali dengan tujuan tidak terlalu panas pada sampel organ. Setelah dihomogenkan ditambahkan lagi trizol sebanyak 250  $\mu$ l kemudian didiamkan di suhu ruangan selama 5 menit. Setelah itu sampel di tambahkan klorofom sebanyak 100  $\mu$ l dan dikocok kuat untuk memisahkan antara trizol dengan RNA pada sampel selama 30-60 detik atau bisa juga menggunakan alat vortex agar homogen, kemudian di simpan di suhu ruangan 3 menit. Selanjutnya sampel di sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Setelah disentrifugasi akan terlihat 2 bagian yaitu supernatan dan pelet, supernatan dipindahkan ke tabung 1,5 ml yang baru dan steril sebanyak  $\pm$ 200  $\mu$ L lalu tambahkan isopropanol sebanyak  $\pm$ 200  $\mu$ L (perbandingan supernatant dan isopropanol yaitu 1 : 1) lalu dihomogenkan dengan membentuk angka delapan lalu disimpan di suhu ruangan selama 10 menit. Langkah selanjutnya yaitu sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 20 menit, setelah itu

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***

**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN***Spirulina*

*plantesis*

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

supernatan dibuang dan yang tersisa hanya pelet. Pelet yang tersisa ditambahkan alkhol 70% sebanyak 1 ml, setelah penambahan alkohol disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Tahap selanjutnya tabung dibalik di atas tisu tebal steril selama 15-30 menit agar didapatkan pelet yang kering. Setelah kering pelet dilarutkan dengan air deion depc  $\pm 30 \mu\text{L}$  dan disimpan di wadah es kemudian disimpan di *freezer* dengan suhu  $-20^\circ\text{C}$  (Mendez, dkk. 2011),

### 3.7.6 Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi RNA

Pada RNA pengukuran kemurnian dan konsentrasi merupakan uji kuantitas RNA menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis (Milton Roy Spectronic). Tujuan dari pengukuran ini untuk mengetahui kemurnian serta konsentrasi RNA dari hasil ekstraksi. Sebelum melakukan pengukuran disiapkan dahulu alat dan bahan yang akan digunakan. Alat yang digunakan kuvet, tabung 1,5 ml, tips tisu lensa. Bahan yang digunakan sampel RNA yang akan diuji, ddH<sub>2</sub>O, akuades, alkohol. Tahap pertama sampel RNA diambil sebanyak 5  $\mu\text{l}$  dimasukkan kedalam tabung 1,5 ml steril ditambahkan 495  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O kemudian di homogenkan. Sebelum dimasukkan sampel ke dalam kuvet, kuvet harus dibilas dengan akuades dan alcohol 70% kemudian memasukkan blanko yaitu ddH<sub>2</sub>O sebanyak 500  $\mu\text{l}$ . Setelah blanko sampel dimasukkan kedalam kuvet kemudian ditekan tombol *measure* sampel maka alat akan menghitung dan menampilkan nilai kemurnian RNA yang di uji. Pada pengukuran kemurnian RNA dapat dihitung dengan rumus A260/A280.

**Neng Dina Mardiani, 2018**  
**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***  
**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**  
**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH  $20^\circ\text{C}$**   
**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina***  
*plantesis*  
Universitas Pendidikan Indonesia |  
repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### 3.7.7 Elektroforesis Hasil Ekstraksi RNA

Kualitas RNA dapat diketahui dengan melakukan proses elektroforesis dengan menggunakan agarose 1% dalam 30 ml TAE 2X. Elektroforesis gel dilakukan untuk mengetahui kualitas RNA dengan cara melihat ukuran fragmen RNA serta kemurniannya (Facthiyah, 2011). Sebelum memulai proses elektroforesis bahan dan alat disiapkan terlebih dahulu. Gel Agarose 1% dipanaskan di microwave sampai cair lalu tambahkan 1  $\mu$ l *peqgreen* kedalam agarose, kemudian dicetak dalam alat cetakan khusus agarose untuk RNA. Setelah kering agar dimasukkan ke dalam alat elektroforesis yg berisi buffer TAE 2X. Sampel yang dimasukkan kedalam sumur yaitu 3  $\mu$ l sampel RNA, 1  $\mu$ l LD, dan 1  $\mu$ l formamide kemudian dicampur di dalam tabung PCR yang steril lalu dimasukkan kedalam sumur dengan posisi tegak lurus. Selanjutnya menggunakan marker 100bp DNA ladder merk Bioresearch sebanyak 3  $\mu$ l. Setelah sampel dan marker dimasukkan selanjutnya proses elektroforesis berlangsung selama 30 menit dengan tegangan 50V. Hasil elektroforesis harus dilihat di ruang gelap menggunakan sinar UV maka akan terlihat pita yang terbentuk dan di dokumentasikan.

### 3.7.8 Sintesis cDNA

Untuk tahapan sintesi cDNA menggunakan kit dari Thermo Scientific. Sebelum ke tahapan sintesis cDNA dilakukan penghilangan DNA terlebih dahulu dengan menambahkan 1  $\mu$ l DNase pada stock RNA 1  $\mu$ g dan MgCl<sub>2</sub> 10X sebagai buffer sebanyak 1  $\mu$ l, lalu tambahkan *rnase free water* sampai volume 10  $\mu$ l. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit di dalam alat PCR, lalu ditambahkan 1  $\mu$ l EDTA 50mM disimpan di suhu 65°C selama 10 menit menggunakan alat PCR. Sampel RNA dari

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***

**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina***

*plantesis*

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

stok yang telah dipurifikasi sebanyak 11  $\mu$ L lalu ditambahkan kit untuk sentesis cDNA, yaitu 1  $\mu$ L oligo dTE, 4  $\mu$ L 5X Reaction Buffer, 2  $\mu$ L Reveraid Reverse Transcriptase, dan *rnase free water* sampai volume 20  $\mu$ L. Setelah itu dimasukkan ke mesin PCR lalu diatur suhu yang akan digunakan. suhu yang akan digunakan yaitu pada 42°C selama 60 menit dan 70°C selama 5 menit. Metode ini dilakukan berdasarkan protokol yang ada pada kit RevertAid First Strand.

### 3.7.9 Amplifikasi *Housekeeping* Gen

Isolasi gen diambil dari stok cDNA yang telah dibuat, dengan mengambil sampel sebanyak 0,3  $\mu$ L dan menambahkan 5  $\mu$ L Mix enzim, 1  $\mu$ L Primer FR dari gen *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) dan air deion sampai volume mencapai 10  $\mu$ L. Lalu dimasukkan kedalam mesin PCR, dan diatur suhu nya, yaitu untuk suhu pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, suhu denaturasi 95°C selama 30 detik, suhu annealing 55°C selama 30 detik, suhu ekstensi 72°C selama 45 detik, suhu ekstensi akhir 72°C selama 10 menit, dan terakhir suhu penyimpanan di 10°C. Untuk di suhu denaturasi, *annealing* dan ekstensi diatur sebanyak 35 siklus. Untuk proses amplifikasi gen 18S rRNA sama seperti gen GAPDH hanya yang membedakan suhu annealing pada gen 18S rRNA dan ODC.

Primer yang digunakan yaitu primer yang berasal dari peneliti sebelumnya yaitu primer GAPDH (Kusumawaty, 2015) sedangkan primer 18S rRNA didapatkan dari penelitian Sylvi (2018) dari komunikasi pribadi. Berikut urutan primer yang digunakan dalam penelitian ini dilihat pada Tabel 3.1.

**Neng Dina Mardiani, 2018**  
**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***  
**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**  
**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**  
**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN***Spirulina*  
*plantesis*  
Universitas Pendidikan Indonesia |  
repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Tabel 3. 1 Urutan Primer

Gen		Sikuen	Ta <sup>o</sup> C
GAPDH	Forward	5'GCTCAGCGTGTGGTTGTG'3	55
	Reverse	5'CCTGGTCCTCGGTGTAACC'3	
18s rRNA	Forward	5'TTGGATAACTGTGTGGCAATTCC'3	55
	Reverse	5'TGAGAGATTCCCGTGTGAGTC'3	
ODC	Forward	5'GATGACCTTGATAGTGAGGTG G'3	58
	Reverse	5'AGAGGCCAAACTCCTCATCCAT'3	

### 3.7.10 Elektroforesis Hasil Amplifikasi *Housekeeping* gen

Untuk elektroforesis hasil pcr dari gen tersebut maka sampel pcr dimasukkan sebanyak 3  $\mu$ l ditambahkan 1  $\mu$ l LD, kemudian di homogenkan sampai merata lalu di masukkan kedalam sumur agarose. Marker yang di gunakan sebanyak 3  $\mu$ l. Setelah sampel dan marker yang dimasukkan kedalam sumur gel agarose 1%, selanjutnya di elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100V. setelah selesai proses elektroforesis maka hasil di bawa keruang gelap dan di lihat di sinar UV kemudian di dokumentasikan.

**Neng Dina Mardiani, 2018**

**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING*  
PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)  
YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**

**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina*  
*plantesis***

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### **3.8 Analisis menggunakan *software* ImageJ**

Analisis dilakukan dengan *software* ImageJ untuk mendapatkan nilai ketebalan pita berdasarkan ketebalan pixel gambar dan luas area pita. Pengukuran ImageJ dilakukan untuk mengetahui kestabilan dari setiap gen dengan mengukur pita hasil elektroforesis.

### **3.9 Analisis Uji Satatistik**

Data pertumbuhan dari ikan gurame di analisis statistic menggunakan aplikasi IBM SPSS *Statistic 22 for windows*. Data yang terdistribusi normal di uji menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk atau Kolmogorov-Smirnov,. Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen diuji dengan non parametrik menggunakan uji Kruskal – Wallis. Analisis ini dilakukan untuk melihat pengaruh yang berbeda nyata dari setiap konsentrasi suplemen *Spirulina plantesis* terhadap pertumbuhan ikan gurame.

**Neng Dina Mardiani, 2018**

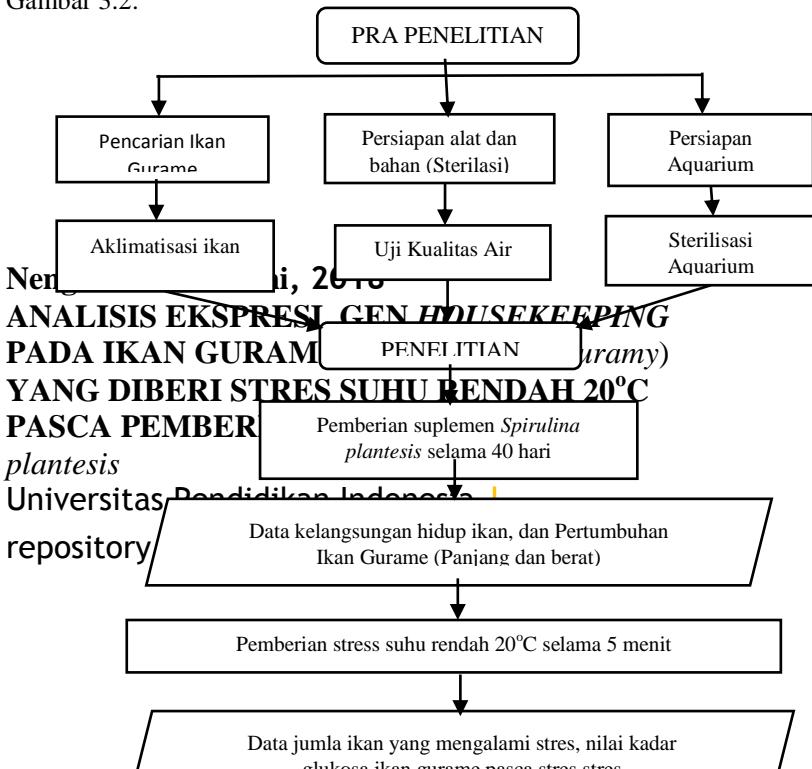
**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING*  
PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)  
YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C  
PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN *Spirulina*  
*plantesis***

Universitas Pendidikan Indonesia |

repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### 3.10 Alur Penelitian

Berdasarkan uraian metode penelitian sebelumnya maka didapatkan bagan alur penelitian seperti yang tercantum dalam Gambar 3.2.



Gambar 3. 1 Diagram Alur Penelitian

**Neng Di... ....., - - -**  
**ANALISIS EKSPRESI GEN *HOUSEKEEPING***  
**PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**  
**YANG DIBERI STRES SUHU RENDAH 20°C**  
**PASCA PEMBERIAN SUPLEMEN***Spirulina*  
*plantesis*  
Universitas Pendidikan Indonesia |  
repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu