

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif merupakan penelitian yang bertujuan untuk mencari unsur-unsur, ciri-ciri, sifat-sifat suatu fenomena. Metode ini dimulai dengan mengumpulkan data, menganalisis data dan menginterpretasikannya. Metode deskriptif dalam pelaksanaannya dilakukan melalui teknik survei, studi kasus, studi komparatif, studi tentang waktu dan gerak, analisis tingkah laku, dan analisis dokumenter (Suryana, 2010).

### **B. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga Mei 2018. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Gedung FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Proses *sequencing* sampel hasil amplifikasi DNA gen *housekeeping* dilakukan di Macro Gen Inc, Seoul Korea Selatan.

### **C. Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Gedung FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan terdapat pada Lampiran 1.

### **D. Prosedur Penelitian**

#### **1. Tahap Persiapan**

Tahap persiapan alat bahan dan persiapan sampel. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit (Sykes, 1969). Pengambilan sampel ikan gurame didapatkan dari pasar tradisional. Jaringan ginjal diambil dan disimpan dalam larutan RNA later. DNA genom dari jaringan ikan didapatkan menggunakan metode ekstraksi DNA

Sylviani Aulia Rahma, 2018

***IDENTIFIKASI GEN HOUSEKEEPING PADA DNA GENOM IKAN GURAME (Osphronemus gouramy)***

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

berdasarkan protokol (Sambrook *et al.* 1989; Ojeda *et al.* 2012) dengan beberapa modifikasi.

## 2. Tahap Prapenelitian

### a. Studi Pendahuluan dan Koleksi Sikuen Gen *Housekeeping*

Pertama-tama dilakukan studi pendahuluan mengenai gen-gen *housekeeping* yang terdapat pada ikan. Selanjutnya dari studi pendahuluan yang didapat, dilakukan survei sikuen gen-gen *housekeeping* pada database *GenBank*. Menurut Housley *et al.* (2006) gen dipilih untuk memberikan cakupan yang cukup merata melintasi seluruh genom organisme. Oleh karena itu pemilihan kandidat gen berdasarkan jumlah sikuen yang tersedia pada database *GenBank* dari *species-species* ikan *Infraclassis* Teleostei, target sikuen yang dipilih pun ditentukan memiliki ukuran 1000-5000 pb, sehingga berdasarkan survei yang didapat pada laman *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) kandidat gen *housekeeping* yang dipilih diantaranya gen *Ribosomal 18S RNA* (18S rRNA), *Ornithine Decarboxylase 1* (ODC1), *TATA-Box Binding Protein* (TBP), *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1* (HPRT1), *Ubiquitin C* (UBC), *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* (G6PD) dan *TATA-Box Binding Protein Associated Factor 2* (TAF2). Selanjutnya sikuen dari gen-gen terpilih dikumpulkan dan disimpan dalam format FASTA dengan ekstensi file .txt.

### b. Perancangan Primer *Degenerate* Gen *Housekeeping*

Primer yang dirancang merupakan primer *degenerate*, dan primer dirancang sebanyak dua pasang yaitu sepasang primer *non-nested* dan sepasang primer *nested*. Sikuen yang dipilih berasal dari daerah *coding DNA sequence* (CDS), yang mana menurut Parker (2001) CDS merupakan bagian dari sikuen DNA mengodekan produk gen (protein) tertentu dan dapat dibedakan dari sikuen regulator lainnya seperti promotor dan operator. Sikuen nukleotida CDS gen *housekeeping* yang sudah terkoleksi dengan format FASTA kemudian dilakukan penjejajaran sikuen menggunakan software *ClustalX2.1 multiple alignment program* (Thompson *et al.* 1994; Hwang *et al.* 2002).

Sylviani Aulia Rahma, 2018

**IDENTIFIKASI GEN HOUSEKEEPING PADA DNA GENOM IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

Universitas Pendidikan Indonesia

| repository.upi.edu |

perpustakaan.upi.edu

Pemilihan pasangan primer *degenerate* dilakukan dengan mengakses hasil *alignment* pada laman *Primaclade* (<http://primaclade.org/cgi-bin/primaclade.cgi>). Hasil amplikon diperkirakan 800-1000 pb. Didapatkan beberapa kandidat primer yang terdapat pada Bab 4 Temuan dan Pembahasan (Tabel 4.2).

Pengetahuan dalam pemilihan primer berdasarkan kriteria primer yang baik merupakan dasar utama yang diperlukan untuk keberhasilan amplifikasi DNA. Menurut Lustbader (2015) beberapa panduan dasar untuk merancang primer diantaranya, primer untuk PCR harus antara 18 hingga 25 nukleotida, harus memiliki konten GC antara 40% dan 60%, dalam 5 basa terakhir pada ujung 3' pastikan setidaknya terdapat 2 basa G atau C (*GC clamp*) karena pasangan basa G-C memiliki ikatan yang lebih kuat (3 ikatan hidrogen) daripada pasangan A-T (2 ikatan hidrogen), suhu  $T_m$  rata-rata harus berkisar antara 55°C dan 65°C, secara umum toleransi nilai  $\Delta G$  untuk analisis dimer harus antara 0 hingga -9 kcal/mol, terakhir pasangan primer harus memiliki  $T_m$  yang sama dengan selisih maksimum 5°C.

### 3. Tahap Penelitian

#### a. Isolasi DNA Genom Ikan Gurame

DNA genom dari jaringan ikan didapatkan menggunakan metode ekstraksi DNA berdasarkan protokol (Sambrook *et al.* 1989; Ojeda *et al.* 2012) dengan beberapa modifikasi. Ikan gurame dengan berat sekitar 500 gram didapatkan dari pasar tradisional. Ikan gurame dibedah dan diambil bagian organ ginjal, selanjutnya organ disimpan pada larutan RNA-later dan disimpan pada suhu -20°C.

Isolasi DNA diawali dengan tahap ekstraksi, yaitu sebanyak 25 mg jaringan ginjal dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang terdapat 500  $\mu$ l buffer lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 1% SDS, dan 50 mM NaCl), selanjutnya jaringan dihancurkan menggunakan *micropestles* sampai homogen. Sampel kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatant ditempatkan pada tabung 1,5 ml barus sebanyak 500  $\mu$ l, dan ditambahkan 300  $\mu$ l NaCl 5M. Sampel disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Setelah sentrifugasi, sebanyak 500  $\mu$ l supernatant dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml barus dan selanjutnya ditambahkan isopropanol dengan volume penambah sama dengan volume supernatant. Sampel dihomogenkan membentuk angka 8 sebanyak 5 kali

pengguncangandankemudian dihomogenkan menggunakan vortexsecarasingkat.Tabungberisikansampelkemudiandisentrifugasideng ankecepatan 13.000 rpm selama 15 menit.Padawahapinisupernatandibuangdenganhati-hati agar tidakmengganggupellet (endapan DNA). Pelletkemudiandicucidengan 750  $\mu$ letanol 70% dandisentrifugasikembaliselama 5 menitdengankecepatan 13.000 rpm, selanjutnyaetanoldibuangsecarahati-hatidantabungberisikanpelletdibiarkanterbalikpada alas tisu steril sampaletanol yang adapadadindingtabungbenar-benarkering. Pellet (endapan DNA) kemudiandilarutkandalam 50  $\mu$ l TE buffer 1X dandisimpanpada suhu -20°C (Sambrook *et al.* 1989; Ojeda *et al.* 2012).

#### **b. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat DNA Genom Ikan Gurame**

Uji kualitatif DNA dengan metode elektroforesis gel agaros bertujuan untuk mengetahui keberadaan DNA dalam larutan isolat DNA, sedangkan uji kuantitatif DNA dengan spektrofotometri merupakan suatu metode analisis untuk mengukur konsentrasi suatu senyawa berdasarkan kemampuan senyawa tersebut mengabsorpsi berkas sinar atau cahaya (Rahmasari *et al.* 2014).

Uji kualitatif DNA diawali dengan menimbang gel agaros sebanyak 0,3 g dan dimasukkan dalam botol sampel DURAN 100 ml. Selanjutnya buffer TAE 1X ditambahkan sebanyak 30 ml kemudian botol DURAN ditutup tidak terlalu rapat. Gel agaros pada botol DURAN tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *microwave* hingga larut. Gel agaros yang masih panas didiamkan hingga hangat kuku, kemudian ditambahkan 1  $\mu$ l PeqGreen, botol digoyangkan supaya larut. Cetakan gel agaros disiapkan beserta sisirnya untuk proses pencetakan gel agaros. Gel agaros kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dibiarkan hingga gel mengeras  $\pm$  15 menit. Gel agaros yang siap digunakan kemudiandisimpanpadaalatelektroforesis danditambahkan TAE 1X higgagelterendam. Sampel (isolat DNA)siapdimasukkandalamsumur-sumur yang terdapat pada gelsebanyak 1-5 $\mu$ l.Kemudianrunning *electrophoresis*dimulaidenganmenyetelalatpadavoltase 100 voltselama30 menit, setelahselesai hasil uji kualitatif DNA dapat dibaca dengan mengamati gel padaalatUV-Transiluminator.

Sylviani Aulia Rahma, 2018

**IDENTIFIKASI GEN HOUSEKEEPING PADA DNA GENOM IKAN GURAME  
(*Osphronemus gouramy*)**

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

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi dalam uji kuantitatif DNA dilakukan menggunakan alat Genesys 10uv Scanning (Thermo Scientific) dan Quantus™ Fluorometer (Promega). Proses pengukuran DNA menggunakan alat Genesys 10uv Scanning dilakukan dengan mengencerkan isolat DNA yang akan digunakan konsentrasinya hingga 100X (5 µl sampel DNA dan 495 µl ddH<sub>2</sub>O), sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm pada alat spektrofotometer *UV-Vis*. Setelah nilai absorbansi diketahui maka kemurnian DNA dan konsentrasi DNA dapat diketahui. Proses pengukuran DNA menggunakan alat Quantus™ Fluorometer berdasarkan protokol alat yang dikeluarkan oleh Promega (2017). Bahan yang disiapkan diantaranya QuantiFluor® dsDNA *working solution*, larutan buffer TE 1X, *blank sample*, *standard sample*, dan sampel uji (isolat DNA). Alat dikalibrasi dengan *blank* dan *standard sample*. Selanjutnya sebanyak 1 µl isolat DNA dilarutkan dalam 99 µl larutan buffer TE 1X pada tabung PCR 0,5 ml. Larutan dihomogenkan dengan *vortex* selama 15 detik. Larutan QuantiFluor® dsDNA *dyeworking solution* ditambahkan ke dalam tabung sampel uji sebanyak 100 µl untuk total volume kuantifikasi 200 µl, kemudian dihomogenkan kembali menggunakan *vortex* selama 15 detik. Sampel uji diinkubasi selama 5 menit dalam kondisi gelap. Alat Quantus™ Fluorometer diatur ke protokol dsDNA, pilih volume sampel yang akan diuji (1 µl) dan unit konsentrasi yang diinginkan, kemudian konsentrasi sampel uji diukur.

Menurut Fatchiyah (2010) kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi  $\lambda$  260 nm dibagi dengan nilai absorbansi  $\lambda$  280 nm ( $\text{\AA}260/\text{\AA}280$ ), adapun nilai kemurnian DNA yang baik berkisar 1.8-2.0. Untuk mengukur konsentrasi DNA digunakan rumus sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] = \text{\AA}260 \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

$\text{\AA}260$  = Nilai absorbansi pada  $\lambda$  260 nm

50 = larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 µg untai ganda DNA per ml (dsDNA)

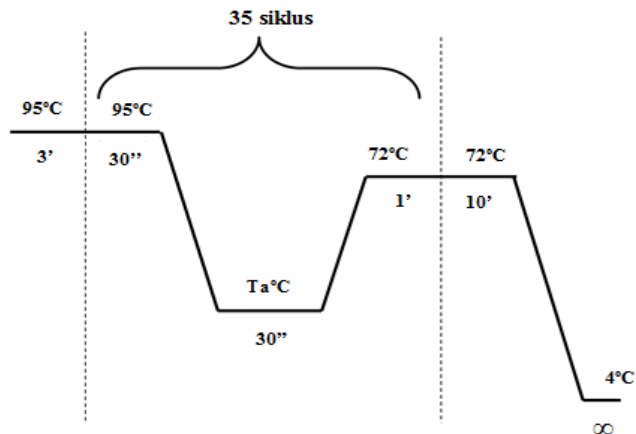
### c. Amplifikasi Gen *Housekeeping* pada DNA Genom Ikan Gurame dengan Metode PCR

Amplifikasi PCR menggunakan dua pasang primer *degenerate* yaitu sepasang primer *nested* dan sepasang primer *non-nested* pada DNA genom ikan gurame dilakukan dengan masing-masing total reaksi sebanyak 10 µl. Komposisi PCR yang digunakan terdiri dari 5 µl GoTaq Green PCR Master Mix 2X, 1 µl *Mix DNA* atau DNA *template* (1 µg/ul), 0,5 µl Primer *Forward* (0,5 µM), 0,5 µl Primer *Reverse*

(0,5µM), dan 3 µl ddH<sub>2</sub>O. Amplifikasi dilakukan dengan bantuan alat *Thermocycler* dengan program Effendorf MasterCycler Personal (Applied Biosystem, 2004) yang disetel dengan beberapa pengaturan untuk melaksanakan beberapa kondisi. Program PCR yang digunakan berdasarkan protokol *GoTaq Green Master Mix* (Promega, 2016) dengan beberapa modifikasi.

Proses amplifikasi berlangsung sebanyak 35 siklus dan diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selam 30 detik, kemudian dilanjutkan dengan tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap *annealing* atau penempelan primer pada suhu sesuai kondisi spesifik masing-masing primer, selama 30 detik. Selanjutnya tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian tahap ekstensi akhir selama 10 menit pada suhu 72°C, terakhir tahap *holding* pada suhu 4°C (Gambar 3.1). Dilakukan optimasi suhu *annealing* (Ta) pada program PCR guna mendapatkan hasil amplifikasi terbaik. Hasil amplifikasi dielektroforesis sebanyak 1-5 µl pada konsentrasi gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1X selama 30 menit pada 100 volt.

Apabila pita spesifik belum didapatkan dengan pasangan primer *degenerate non-nested* (PCR pertama), maka sebanyak 1 µl hasil amplifikasi PCR pertama diambil dan diencerkan 25X dengan ddH<sub>2</sub>O dan sebanyak 1 µl diambil sebagai sumber *template* yang akan digunakan pada proses PCR kedua menggunakan pasangan primer *degenerate nested* dengan reaksi PCR sama dengan reaksi PCR pertama. Setelah pita spesifik didapatkan, selanjutnya diperbanyak dengan total reaksi 60 µl, sebanyak 1-5 µl digunakan untuk elektroforesis, 5 µl digunakan untuk menghitung konsentrasi ampikon DNA, dan sebanyak 50 µl dikirim ke Macrogen Inc, Seoul Korea Selatan untuk *sequencing* secara langsung tanpa dikloning (Kusumawaty, 2015).



Gambar 3.1 Program PCR Berdasarkan Protokol Gotaq Green Master Mix (Promega, 2016) dengan Beberapa Modifikasi.

#### d. Analisis Data

##### 1) *Contig*

Dua set data urutan basa nukleotida yang didapatkan dari hasil *sequencing* diolah dan digabung (*contig*) menggunakan aplikasi *CodonCode Aligner*. Satu set berasal dari hasil *sequencing* menggunakan primer *forward* dan satu set data lainnya dari hasil *sequencing* menggunakan primer *reverse*. Setiap basakonsensus yang didapatkemudian dianalisis dengan melihat *peak* pada hasil *sequencing*, kemudian bagian hulu dan hilir sikuen dibuang berdasarkan *peak* yang terbentuk. Setelah dibuang bagian hulu dan hilir sikuen, maka didapatkan sikuen DNA genom ikan gurame, dan selanjutnya sikuen disimpan dalam format FASTA dengan ekstensi file.txt.

##### 2) **BLAST**

Analisis data hasil *contig* sikuen DNA genom ikan gurame dilakukan dengan melakukan pengecekan sikuen secara *online* pada laman <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/> untuk proses BLAST. Pengecekan dilakukan dengan mengunggah sikuen yang didapat pada laman NCBI dengan pilihan *Nucleotide Blast*. Sikuen-sikuen yang homolog kemudian dikumpulkan dalam format FASTA dengan ekstensi file .txt.

### 3) **Data Editing**

Sikuen DNA genom gurame dan sikuen-sikuen DNA homolog yang muncul pada saat BLAST, kemudian di-*alignment* menggunakan program Clustal W pada aplikasi BioEdit (Hall, 1999; Kim *et al.* 2008). Proses *editingsikuen* dilakukan dengan membuang bagian hulu dan hilir dari keseluruhan sikuen menyesuaikan panjang dari sikuen DNA genom gurame.

### 4) **Konstruksi Pohon Filogenetik**

Analisis filogenetik dilakukan menggunakan metode *Maximum Parsimony* (MP) pada program aplikasi PAUP\*4.0b10 berdasarkan protokol PAUP berbasis window (Hidayat, t.t.) dengan analisis bootstrapping 5000 kali ulangan, dilakukan untuk memperkirakan derajat kepercayaan dari masing-masing Klad yang terbentuk. Pohon yang telah terbentuk kemudian dianalisis untuk mengetahui karakterisasi gen-gen *housekeeping* pada ikan gurame dengan organisme sekerabatnya (Felsenstein, 1985; Kim *et al.* 2008).

#### e. **Perancangan Primer Spesifik Gen *Housekeeping* Ikan Gurame**

Sikuen DNA genom ikan gurame yang didapatkan dari analisis *sequencing*, digunakan sebagai sumber untuk merancangan primer spesifik. Sikuen DNA diunggah pada laman *Primaclade* (<http://primaclade.org/cgi-bin/primaclade.cgi>), untuk mengetahui kemungkinan posisi primer. Primer terpilih kemudian dicek pada laman Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Primer spesifik yang dipilih dengan kriteria ampikon yang dihasilkan kurang dari 200 pb.

#### f. **Alur Penelitian**

Penelitian diawali dengan tahap persiapan, tahap prapenelitian, tahap pelaksanaan penelitian, dan analisis data. Tahap persiapan terdiri dari sterilisasi alat dan bahan. Tahap prapenelitian dimulai dengan studi

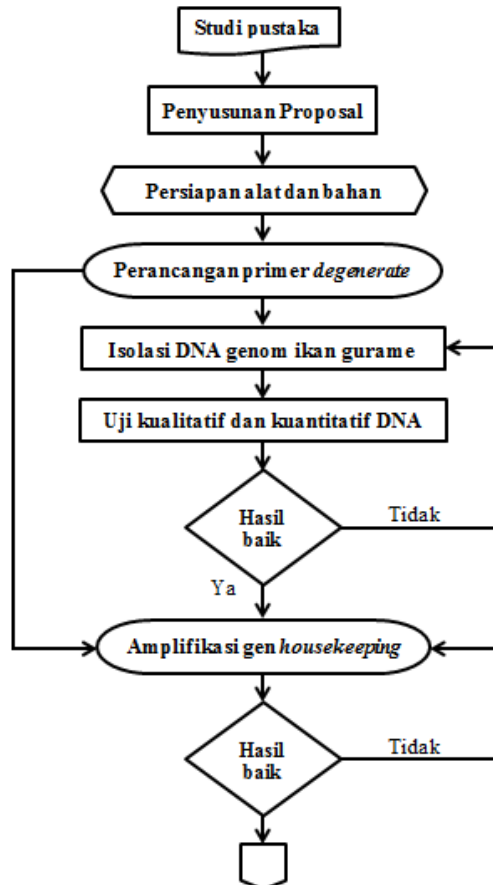
Sylviani Aulia Rahma, 2018

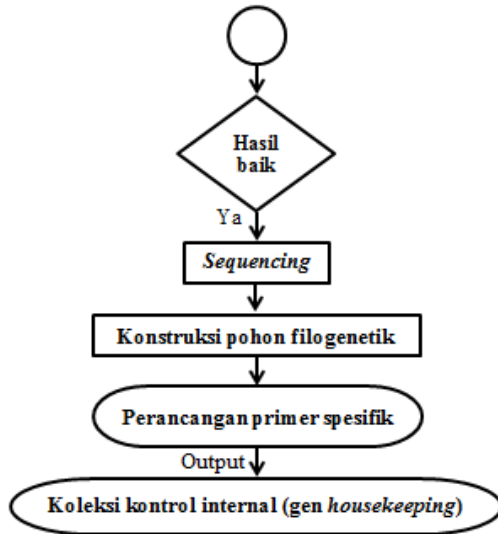
**IDENTIFIKASI GEN *HOUSEKEEPING* PADA DNA GENOM IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)**

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



pendahuluan dan studi literatur terkait gen *housekeeping* dan pemilihan kandidat gen, serta perancangan kandidat gen *housekeeping*. Tahap pelaksanaan dimulai dari isolasi DNA, uji kualitas dan kuantitatif isolat DNA, amplifikasi gen *housekeeping* menggunakan primer yang dirancang, tahap *sequencing* di Macrogen, analisis hasil *sequencing*, konstruksi pohon filogenetik, dan perancangan primer spesifik gen *housekeeping*.





Gambar 3.2 Bagan Alur Penelitian