

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Menurut Sugiyono (2009) penelitian eksperimen adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendalikan.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Oktober 2018 di Laboratorium Riset Bioteknologi dan Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

C. Alat dan Bahan

Pada penelitian ini membutuhkan alat dan bahan untuk dilakukan pemeliharaan ikan, pemberian paparan dengan suhu 20°C, pembedahan dan analisa kadar glukosa darah ikan, isolasi RNA, uji kuantitatif dan kualitatif hasil isolasi RNA, sintesis cDNA, amplifikasi cDNA, elektroforesis gel agarosa hasil amplifikasi cDNA dan analisa pita cDNA pada gel agarose menggunakan *software* ImageJ. Alat dan bahan tersedia di laboratorium Riset Bioteknologi dan Riset Lingkungan namun ada beberapa yang tidak tersedia. Daftar alat dan bahan yang digunakan dilampirkan pada Lampiran I.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah ikan gurame strain Soang dengan ukuran 5.6-6 cm, umur 4 bulan yang berasal dari petani gurame Singaparna, Tasikmalaya, sedangkan sampel yang digunakan adalah organ ginjal ikan gurame yang telah diberi pakan campuran tepung *S.platensis* dan paparan suhu 20°C sebelumnya. Selanjutnya sampel dilakukan isolasi mRNA total untuk dilakukan amplifikasi PCR dan dianalisis menggunakan *software* ImageJ untuk mengetahui stabilitas gen *housekeeping* yang didapatkan.

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPARAN SUHU 20°C

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

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Pra-penelitian

a. Persiapan Alat dan Bahan

Pada penelitian ini dipersiapkan akuarium dengan ukuran p=45 cm x t=25 cm x l=23 cm sejumlah 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 akan digunakan pada proses pemeliharaan ikan gurame pada tahap aklimatisasi dan perlakuan. Sebelum digunakan untuk perlakuan, akuarium disterilisasi terlebih dahulu menggunakan larutan hipoklorit dan didiamkan selama 24 jam, kemudian dicuci sampai bersih dan dijemur dibawah terik matahari dengan tujuan untuk mematikan mikroorganisme didalamnya.

Persiapan alat yang digunakan pada proses isolasi mRNA total seperti botol duran, gelas ukur dan *beaker glass* dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan, kemudian direndam pada larutan DEPC selama 24 jam dan dikeringkan didalam oven sampai kering. Setelah itu alat dan bahan yang akan digunakan pada proses isolasi RNA disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 40 menit

b. Uji Kualitas Air

Sebelum dilakukan perlakuan air yang digunakan harus diuji terlebih dahulu untuk mengetahui kualitas air. Pada penelitian ini menggunakan Kit test air *Aqua Esha quick test*, parameter yang diamati meliputi nilai pH, nitrat, nitrit chlor, kesadahan, alkalinitas. Setelah itu untuk meminimalisir zat-zat yang tidak diinginkan pada air maka digunakan filter air kran "*Micone*" yang berfungsi untuk menyaring air yang mengandung partikel seperti lumpur, pasir, bau dan zat besi lainnya. Adapun rentang nilai menunjukkan kondisi perairan ikan pada akuarium yang optimum pada Tabel 3.1 berdasarkan protokol Kit *Aqua Esha quick test*.

Tabel 3.1

Rentang nilai kualitas air berdasarkan Kit *Aqua Esha Quick Test*

Parameter	Rentang nilai
Keasaman (pH)	6.8-7.6
(KH)	4-10°dH
(GH)	6-12°dH

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPARAN SUHU 20°C

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

Nitrat (NO ₂)	<0.3 mg/l
Nitrit (NO ₃)	25-100 mg/l
Klor (Cl ₂)	<0.8 mg/l

Keterangan : Berdasarkan Kit *Aqua Esha Quick Test*

c. Kelulushidupan Ikan Gurame Selama Aklimatisasi

Sumber ikan yang digunakan pada penelitian ini berasal dari petani gurame daerah tasikmalaya yang berukuran silet dengan panjang rata-rata 3-4 cm, berat kisaran 2-3 gram dengan umur 2 bulan. Ikan diaklimatisasi terlebih dahulu pada akuarium. Akuarium yang digunakan pada tahap aklimatisasi menggunakan akuarium yang berbeda-beda dikarenakan adanya keterbatasan alat yang digunakan sehingga menggunakan ukuran jumlah ekor/liter dengan tujuan menyesuaikan padat tebar yang sama pada setiap akuarium. Pada tahap aklimatisasi ini menggunakan metode Harir (2010) gurame yang berukuran ± 3 cm dilakukan padat tebar 6 ekor/liter. Akuarium dilengkapi dengan batu aerasi, *filter* dan *heater* yang telah diset pada suhu 29°C. Pada masa aklimatisasi ikan diberi pakan pelet biasa dengan ukuran pelet PF500 (diameter 0,5-0,7 mm) sesuai bukaan mulut ikan. Selama aklimatisasi ikan dihitung jumlah kematian dan nilai kualitas air menggunakan *kit Esha Quick Test*.

d. Pembuatan Pakan Uji

Pakan uji yang digunakan pada penelitian ini merupakan pelet kering yang bersifat tenggelam, berasal dari PT Matahari Sakti dengan ukuran 0.5-0.7 mm. Komposisi pakan yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 2. *S. platensis* yang digunakan adalah *S. platensis* berasal dari PT. Sari Indah Windu yang telah dikeringkan dan berbentuk tepung dengan ukuran 120 mikron. Pembuatan pakan uji menggunakan metode (Ricky *et al.*, 2014) dengan tahapan pembuatan pakan ialah dengan menimbang tepung *S.platensis* terlebih dahulu sesuai konsentrasi yang digunakan, kemudian dicampur dengan *Carboxymethyl cellulose* (CMC) yang berfungsi sebagai perekat tepung *S.platensis* pada pakan (pelet) sebanyak 1 gr/100gr pakan dalam satu

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPAN SUHU 20 °C

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

wadah dan diaduk sampai rata, kemudian tepung *S.platensis* yang telah diaduk rata dengan CMC diberi air hangat secukupnya agar mudah larut. Selanjutnya pakan dituangkan kedalam wadah yang berisi tepung *S.platensis* dan CMC yang telah dilarutkan dalam air. Lalu diaduk campuran tersebut sampai tepung *S. platensis* lengket merata pada pakan. Jika telah sudah lengket merata pakan dikeringkan pada oven pada suhu 50°C selama 20-30 menit sampai kering.

2. Tahapan Penelitian

a. Kelulushidupan Ikan Gurame Selama Penelitian

Sebelum dilakukan penebaran pada akuarium, ikan yang bertahan hidup selama 5 minggu serta sehat dan terlihat gesit pada proses aklimatisasi ditimbang dan dihitung berat badan awal kemudian di rata-ratakan dan panjang tubuh total diukur per individu dan dirata-ratakan. Ikan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan gurame strain soang dengan panjang tubuh rata-rata 7 cm dan berat tubuh rata-rata 6-7 gram. Pemeliharaan ikan dilakukan pada akuarium dengan ukuran yang diisi dengan ketinggian air 17 cm dan dilengkapi dengan aerator, filter dan *heater* yang diset pada suhu 28-29°C. Ikan uji ditebar sebanyak 30 ekor pada setiap konsentrasi dengan menggunakan metode (Nirmala & Rismawan, 2010) yaitu 4 ekor/liter dengan ukuran ikan ± 7 cm ditebar pada akuarium.

Sebelum perlakuan, ikan dipuasakan terlebih dahulu 24 jam hal ini dilakukan untuk menghilangkan sisa pakan dalam saluran pencernaan dan dilakukan penimbangan ikan untuk mengetahui bobot pakan yang dikonsumsi. Pemeliharaan dilakukan selama 40 hari. Pakan diberikan sebanyak 2 kali sehari yakni pagi dan sore hari, sebanyak 3% dari bobot ikan (Mudjiman, 2007). Selama masa pemeliharaan dilakukan pengujian kualitas air menggunakan *Aqua Esha Quick Test*. Selain itu dilakukan penyifonan 20% dari volume total air sebelum pemberian pakan. Parameter kualitas air yang diukur adalah pH, ammonia, kesadahan, klor dan suhu, alkalinitas.

b. Desain Eksperimen

Penelitian ini dilakukan dengan pemberian campuran tepung *S.plantesis* pada pakan dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0%, 1% dan 3%. Pengamatan dilakukan setiap 20 hari sekali selama 40 hari pemeliharaan. Pengamatan dilakukan pada awal, tengah dan akhir perlakuan, pengamatan hasil meliputi: laju pertumbuhan

1) Pengukuran Panjang Ikan

Pengukuran panjang meliputi panjang total ikan dari mulut sampai ujung ekor ikan. Pengukuran panjang ikan menggunakan meteran berskala millimeter. Perhitungan panjang dihitung menggunakan rumus Effendie (1979), yaitu :

$$P_m = P_t - P_0$$

Keterangan :

P_m : Pertumbuhan panjang mutlak ikan (cm)

P_t : Panjang ikan pada waktu ke-t (cm)

P_0 : Panjang ikan pada waktu ke-0 (cm)

2) Pengukuran Berat Ikan

Pertambahan berat dihitung dengan rumus Effendie (1979), yaitu:

$$W_m = W_t - W_0$$

Keterangan :

W_m : Pertumbuhan panjang mutlak ikan (cm)

W_t : Panjang ikan pada waktu ke-t (cm)

W_0 : Panjang ikan pada waktu ke-0 (cm)

c. Analisa Glukosa Darah dan Pengamatan Warna Kulit Ikan

Gurame yang diberi Paparan suhu 20°C

Sebanyak dua akuarium dengan ukuran p=45 cm x t=25 cm x l=23 cm digunakan sebagai wadah uji, diset terlebih dahulu pada suhu 20°C

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPAN SUHU 20 °C

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

menggunakan alat *cooling fan* akuarium “Rayden”. Akuarium yang digunakan diisi air 26 Liter, dilengkapi thermometer untuk mengukur suhu akuarium. Sebanyak 77 ekor diberi perlakuan stres menggunakan metode Hastuti *et al.*, (2003) dengan cara ikan diangkat dan dipindahkan kedalam akuarium dengan perubahan suhu air media A-9°C yang lebih rendah dari suhu air media pemeliharaan mula-mula. Suhu air dalam akuarium dijaga pada kisaran 20°C. Pelakuan ini berlangsung selama lima menit. Kemudian ikan diamati perilaku, perubahan warna kulit ikan dan kelangsungan hidup. Setelah itu ikan dipindahkan kedalam akuarium pemeliharaan semula.

Setelah pemberian paparan suhu 20°C, ikan dipingsankan terlebih dahulu menggunakan metode Arsyad *et al.*, (2014) ikan dimasukan kedalam *styrofoam* yang telah berisi es dengan suhu 8°C, kemudian ikan diamati sampai ikan tersebut menunjukkan gejala pingsan seperti posisi tubuh miring dan tidak aktif berenang. Kemudian dilakukan pembedahan ikan dan pengambilan sampel darah ikan menggunakan metode Hastuti *et al.*, (2004) namun karena adanya keterbatasan sampel dan alat, sehingga analisa kadar glukosa darah diambil pada titik puncak yaitu pada saat 0, 2, 6, 24 jam pasca stres.

Setelah perlakuan selesai, ikan diambil sebanyak 3 ekor untuk pengambilan darah dengan teknik punksi pembuluh darah bagian caudal dan jantung. Pengambilan darah dengan teknik ini yaitu dengan menyiapkan spuit insulin lengkap dengan jarumnya kemudian dihisap larutan heparin sampai memenuhi dinding syringe. Pengambilan darah ikan dengan memposisikan jarum pada garis tengah tubuh belakan sirip anal kemudian dimasukkan jarum kedalam *musculus* sampai mencapai tulang belakang (*columna spinalis*). Kemudian ditarik perlahan-lahan sampai darah masuk ke dalam spuit (Bijanti, 2010). Darah disimpan pada tube 0,5 ml dan disimpan pada suhu 4°C. Setelah itu dilakukan analisa kadar glukosa darah ikan menggunakan alat *One Touch Select Simple*, kelebihan dengan menggunakan alat ini adalah prosesnya lebih mudah, cepat dan akurat. Cara penggunaannya mula-mula kertas strip glukosa dimasukkan kedalam alat digital kemudian ditunggu hingga alat memunculkan gambar darah. Kemudian sampel darah ikan diteteskan ke atas kertas strip dan ditunggu hingga muncul dilayar. Kadar glukosa darah dinyatakan dalam unit mg/dl.

Setelah selesai dilakukan analisa kadar glukosa darah ikan. Tahap selanjutnya adalah pembedahan ikan. Organ ginjal yang diperoleh segera

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPAN SUHU 20°C

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

dimasukan kedalam tabung 1.5 ml yang telah berisi larutan RNA later. Selanjutnya tabung berisi jaringan dan RNA later disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam sebelum disimpan pada suhu -20°C. Sampel jaringan dalam RNA later yang disimpan pada suhu -20°C dapat bertahan selama lebih dari satu tahun.

d. Isolasi mRNA total Organ Ginjal

Pada tahapan ini sampel yang digunakan adalah organ ginjal yang telah diberi perlakuan penambahan campuran tepung *S.platensis* pada jam ke 0 setelah pemberian paparan suhu 20°C. Pada proses ini dilakukan optimasi isolasi RNA dengan menggunakan metode Trizol. Isolasi mRNA total dari jaringan ikan didapatkan menggunakan metode ekstraksi RNA menggunakan Trizol *peqGOLD TriFastTM* berdasarkan metode Chomczynski & Sacchi (1986) yang telah dimodifikasi (Kusumawaty, 2015) dan dimodifikasi kembali. Sampel yang digunakan berasal dari organ ginjal ikan gurame yang telah diberi perlakuan. Sampel sebanyak 25 mg dimasukan kedalam tabung 2 ml yang telah berisi 500 µl trizol. Selanjutnya sampel dihomogenkan menggunakan *homogenizer/mikropestle* sampai halus dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 100 µl chloroform dan dikocok kuat selama satu menit dan dinkubasi selama 3 menit dalam suhu ruang. Sebelum disentrifugasi sampel disimpan didalam *coolbox* terlebih dahulu selama 15 menit. Campuran disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan kedalam tabung 1,5 ml. Selanjutnya ditambah isopropanol (98-100%) ke dalam tabung yang berisi satu kali volume sampel dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian disimpan didalam *coolbox* selama 15 menit kemudian disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang dengan hati-hati agar pellet (endapan RNA) tidak terbuang. Pelet (endapan RNA) yang didapatkan dicuci dengan 1 mL ethanol 70% dan diikuti dengan sentrifugasi pada suhu ruang selama 10.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang didapatkan dikeringkan pada suhu ruang selama 20 menit dan dilarutkan 20-30 µl DEPC.

1. Uji Kualitatif dan Kuantitatif mRNA total Organ Ginjal

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPAN SUHU 20 °C

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

Pengukuran kualitas mRNA total hasil ekstraksi dilakukan dengan uji kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan alat elektroforesis (*Mupid exU*). Pertama-tama gel agarosa 1% dibuat dalam volume 30 ml 2x buffer TAE, dengan cara menimbang agarosa 0,3 gram kemudian ditempatkan pada botol duran 250 ml, ditambahkan 2x buffer TAE sampai volume 30 ml dan diaduk hingga merata. Kemudian dipanaskan dalam *microwave* selama satu menit. Agarosa di dinginkan terlebih dahulu hingga hangat kuku, kemudian ditambahkan larutan *peq green* 1 µl botol digoyangkan supaya larut. Setelah itu larutan dituangkan ke dalam *tray* dan memasang *well-forming combs*, ditunggu selama 30 menit sampai gel agarosa mengeras. *Well-forming combs* kemudian dilepas secara perlahan-lahan. Kemudian *tray* yang telah berisi gel agarosa diletakan ke dalam tank elektroforesis, selanjutnya tank dituangkan larutan 2x buffer TAE hingga menutupi permukaan gel. Setelah itu sampel diambil sebanyak 4 µl menggunakan mikropipet. Sampel diletakan diatas plat tetes, kemudian ditambahkan *loading dye buffer* 1 µl dan *formamide* 1 µl. Sampel diaduk hingga rata menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam sumur pada gel agarose. Setelah sampel dimasukkan kedalam sumur, kemudian *running electrophoresis* pada 50 voltase selama 30 menit. Setelah selesai hasil uji kualitatif RNA dapat dibaca dengan mengamati gel pada alat *UV-Transiluminator*.

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengukur kemurnian dan konsentrasi RNA dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis (*Milton Roy Spectronic*). Faktor pengenceran yang digunakan adalah 100x pengenceran. Pertama-tama dengan menggunakan mikropipet, sampel RNA yang telah larut dalam larutan DEPC diambil 5 µl, kemudian dituangkan kedalam tabung 1,5 ml yang telah bebas RNase. Selanjutnya ditambahkan 495 µl ddH₂O, kemudian divorteks hingga homogen. Spektrofotometer dinyalakan dan diatur. Kemudian "*cuvette*" dibilas DEPC untuk menghindari RNase, tetapi sebelumnya kedua sisi "*cuvette*" dibersihkan terlebih dahulu menggunakan kertas lensa. Larutan sampel RNA yang telah diencerkan dimasukkan kedalam *cuvette* dengan menggunakan mikropipet. Kedua sisi *cuvette* bagian bening dibersihkan menggunakan kertas lensa. *Cuvette* yang telah dibersihkan kemudian diletakkan pada *cuvette compartment* dalam spektrofotometer. Setelah itu akan keluar nilai absorbansi pada layar spektrofotometer. Sehingga telah dapat diketahui nilai kemurnian RNA dan konsentrasi RNA yang

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPAN SUHU 20°C

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

telah didapatkan. Menurut Fatchiyah (2010) kemurnian RNA dapat diukur dengan menghitung absorbansi λ 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi λ 280 nm ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$), adapun nilai kemurnian RNA yang baik berkisar 1.8-2.0. Pengukuran konsentrasi RNA yang didapatkan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$[\text{RNA}] = \text{\AA}260 \times 40 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan :

$\text{\AA}260$ = nilai absorbansi pada λ 260 nm

40 = larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 40 ug untai RNA per ml (ssRNA).

2. Sintesis cDNA

Setelah dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif hasil Isolasi mRNA total ginjal, tahapan selanjutnya adalah sintesis cDNA. Pada proses *Reverse Transcriptase*, mRNA yang terkandung dalam sampel diubah menjadi cDNA. Sintesis cDNA dilakukan dengan mengikuti protokol Kit *Thermoscientific*. RNA sebanyak 1 μg (maksimum 10 μl) dimasukkan kedalam tabung 0,2 ml bebas RNase yang telah berisi campuran dari 2 μl primer dT18, 5 μl buffer, 1 μl Ribolock, 2 μl 10 mM dNTPs, 1 μl enzim MuLV (200U/ μl) dan air ddH₂O yang bebas RNase hingga volume reaksi 20 μl . Kemudian tabung diinkubasi pada PCR selama 60 menit pada suhu 42°C dilanjutkan selama 5 menit pada suhu 70°C. Kemudian hasil sintesis cDNA disimpan pada suhu -20°C.

3. Uji Kualitas Hasil Sintesis cDNA

Kemudian hasil isolasi mRNA yang telah disintesis diuji menggunakan gel agarosa 1% untuk mengetahui keberhasilan sintesis cDNA dan melihat ada tidaknya kontaminasi dari DNA dengan menggunakan primer gen GAPDH (Kusumawaty, 2015). Pada Isolat yang terdapat kontaminasi DNA akan menghasilkan ampikon yang memiliki panjang ukuran lebih besar dibandingkan dengan isolat yang tidak terkontaminasi cDNA.

c. Seleksi Gen Housekeeping menggunakan PCR dan ImageJ

Amplifikasi PCR menggunakan 4 kandidat gen *housekeeping* yaitu *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), *elongation factor 1 alpha* (EF1a) (Kusumawaty, 2015) dan *18S ribosomal RNA* (18S

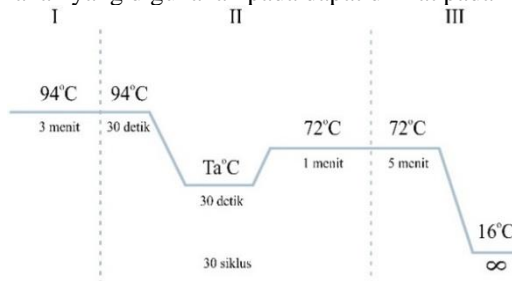
Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG SPIRULINA PLANTESIS DENGAN PAPAN SUHU 20 °C

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

rRNA), *ornithine decarboxylase* (ODC1) yang didapatkan secara komunikasi pribadi. Komposisi PCR yang digunakan terdiri dari 5 μ l GoTaq Green PCR Master Mix 2X, 0,3 μ l cDNA, 0,5 μ l Primer Forward (0,5 μ M), 0,5 μ l Primer Reverse (0,5 μ M) dan 3,7 μ l ddH₂O. Amplifikasi dilakukan dengan bantuan alat *Thermocycler* dengan program *Effendorf Master Cycler Personal* (Applied Biosystem, 2004) yang distel dengan beberapa pengaturan untuk melaksanakan beberapa kondisi. Program PCR yang digunakan berdasarkan protocol *GoTaq Green Master Mix* (Promega, 2016) dengan beberapa modifikasi.

Proses amplifikasi pada gen EF1a dan GAPDH berlangsung sebanyak 30 siklus dan diawali dengan denaturasi awal 94°C selama 3 menit, kemudian diikuti dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing sesuai primer yang digunakan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan diakhiri ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit (Gambar 3.1). Kemudian proses amplifikasi pada gen ODC dan 18sRNA berlangsung sebanyak 35 siklus dan diawali dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, kemudian diikuti dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing sesuai primer yang digunakan dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan diakhiri oleh ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit (Gambar 3.2). Hasil amplifikasi sebanyak 2 μ l kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% dalam 1X buffer TAE pada daya 100 voltase selama 30 menit. Urutan sikuen primer yang digunakan yang digunakan pada dapat dilihat pada Tabel 3.2.

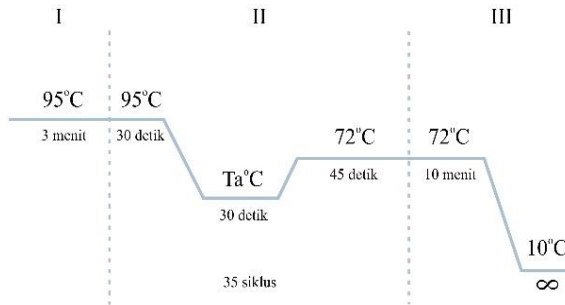


Gambar 3.1 Program PCR untuk mendapatkan gen EF1a dan GADPH menggunakan sampel organ ginjal ikan gurame (*O.gouramy*)

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG SPIRULINA PLANTESIS DENGAN PAPARAN SUHU 20°C

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



Gambar 3.2 Program PCR untuk mendapatkan gen 18sRNA dan ODC1 menggunakan sampel organ ginjal ikan gurame (*O.gouramy*)

Tabel 3.2

Urutan primer dan suhu annealing yang digunakan untuk mengamplifikasi gen-gen target pada ikan gurame (*O.gouramy*)

No	Gen	Sekuen Primer		Produk PCR (bp)	Ta
		Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
1.	GAPDH	GCTCAGCGTGTGGTTTGTC	CCTGGTCCTCGGTGTAACC	500	55
2.	EFla	CTTTGTGCCCATCTCTGGAT	CAACCCTTGAACCAGCAGTCAT	75	60
3.	18S rRNA	TCGAATGTCGCCATCAAC	TCCTATTCCATATTCCTAGCTCC	532	55
4.	ODC1	GATGACCTTTGATAGTAGTGAGGTGG	AGAGGCAAACCTCCTCATCCAT	499	58

cdNA hasil amplifikasi divisualisasi dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 1% dalam 1X buffer TAE dengan pewarna *peq green*. Elektroforesis dilakukan pada 100 voltase selama 30 menit. DNA diamati dengan UV transilluminator. Ukuran DNA yang didapatkan dibandingkan dengan Ladder untuk mengetahui ukuran panjang DNA sampel. Ladder yang digunakan adalah Green Bio Research dengan ukuran panjang 100-1000 bp.

d. Analisa Data

1. Uji Statistik

Data laju pertumbuhan dari ikan gurame di analisa statistika menggunakan aplikasi IBM SPSS *Statistic 22 for windows* dengan

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG SPIRULINA PLANTESIS DENGAN PAPAN SUHU 20 °C

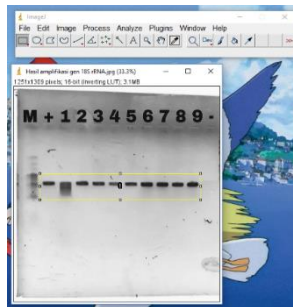
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

menggunakan uji kruskal wallis, post hoc dunn's test dan ANOVA untuk mengetahui pengaruh dari masing-masing konsentrasi dan selama pemeliharaan 40 hari.

2. *Software ImageJ*

Hasil amplifikasi gen pada gel agarosa 1% di analisa menggunakan *software* imageJ untuk mengetahui intensitas pita yang didapatkan, adapun langkah-langkah yang dilakukan yaitu:

- 1) Langkah pertama yang dilakukan adalah membuka *software* ImageJ yang telah diinstall sebelumnya, kemudian klik “File” dan “Open”. Setelah itu klik “Image” → “Threshold” dan “Invert LUT” setelah gambar berhasil seperti Gambar 3.3, selanjutnya klik “Rectangle” dengan membentuk gambar kotak pada pita yang akan dianalisa gambarnya, setelah itu klik “Select First Line”. Maka hasil akan membentuk plot.



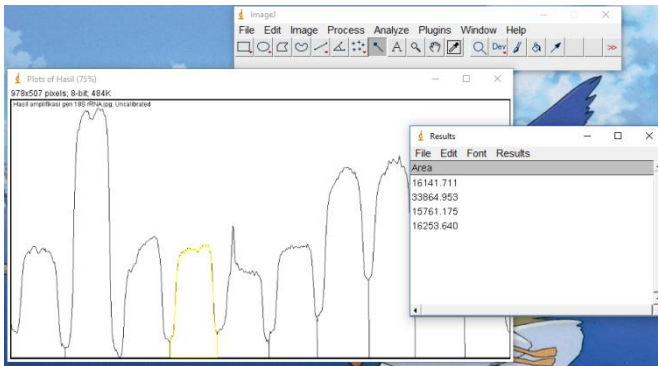
Gambar 3. 3 Langkah Pertama Analisa Menggunakan *ImageJ*

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPARAN SUHU 20 °C

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

- 2) Langkah kedua untuk menghasilkan plot hasil dari rectangle, klik menu “*Analyze*” kemudian klik **➡** “*Gels*” **➡** “*Gel analyzer*” kemudian klik pilihan no peaks, setelah itu klik “*Plot lanes*”. Apabila berhasil akan seperti pada Gambar 3.2. Ambil garis tegak lurus “*Straight*” seperti pada gambar, klik “*tracing*” yang berguna untuk memunculkan hasil dalam bentuk angka yang menjelaskan kisaran ekspresi yang terlihat. Lalu pada bagian-bagian bukit yang telah dibatasi klik satu persatu bukit—bukit plot yang telah dibatasi.
- Gambar 3. 4** Langkah Kedua Analisa Menggunakan *ImageJ*



- 3) Langkah ketiga, setelah mendapatkan nilai intensitas pita data yang didapatkan dapat dianalisa menggunakan *excel* (Gambar 3.5).

	A	B	C	E	F	G	H	I
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								

Gambar 3. 5 Langkah Ketiga Analisa Menggunakan *ImageJ*

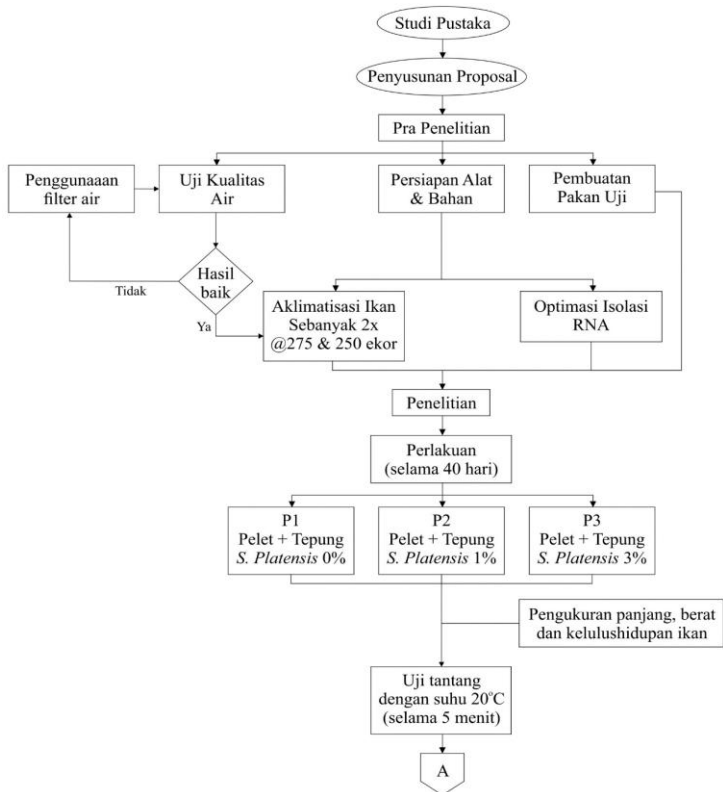
Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPARAN SUHU 20 °C

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

e. Alur Penelitian

Penelitian diawali dengan tahap pra penelitian, tahap pelaksanaan penelitian dan analisa data. Tahapan pra penelitian terdiri dari uji kualitas air, persiapan alat dan bahan, optimasi Isolasi RNA, pembuatan pakan uji dan aklimatisasi ikan. Tahap penelitian dimulai dari pemberian perlakuan pada ikan gurame yang diberi campuran tepung *S.platensis*, pemberian paparan suhu 20°C, analisa glukosa darah, pengambilan sampel organ ginjal, Isolasi RNA, amplifikasi gen *housekeeping* dan analisa menggunakan *software* Image. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.6 dan Gambar 3.7.

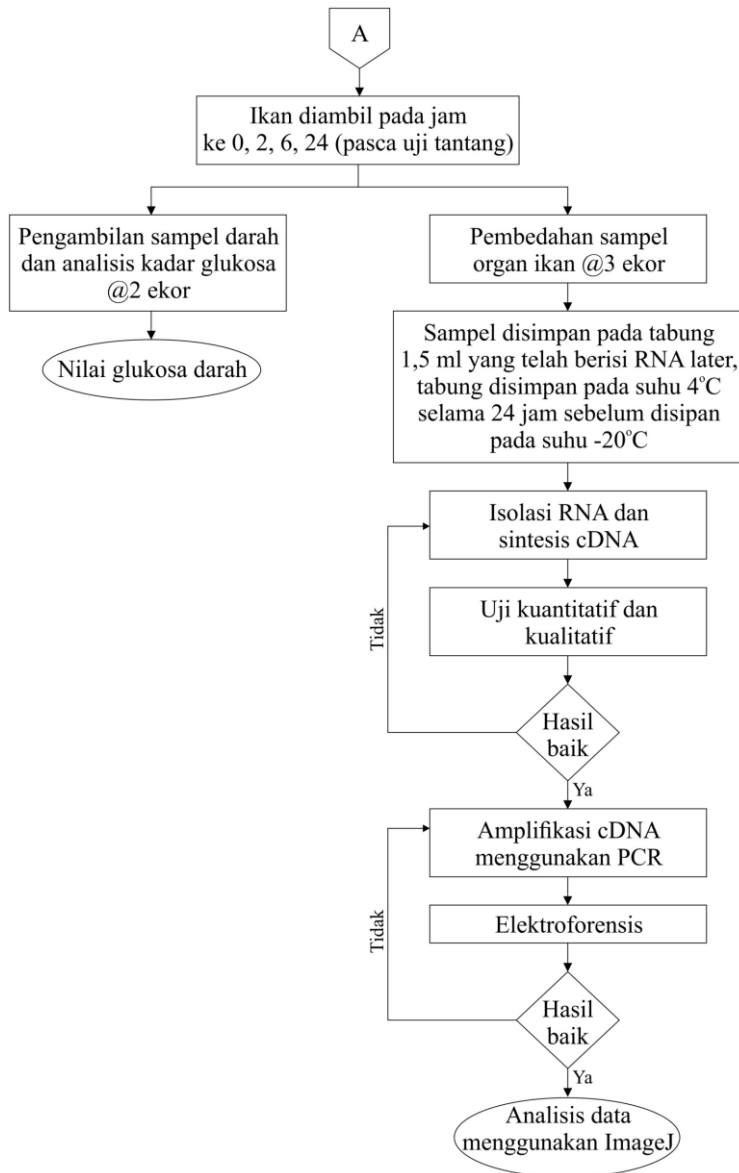


Gambar 3.6 Tahapan Alur Penelitian (A)

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPAN SUHU 20°C

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



Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (*OSPHRONEMUS GOURAMY*) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG *SPIRULINA PLANTESIS* DENGAN PAPARAN SUHU 20 °C

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

Gambar 3.7 Tahapan Alur Penelitian (B)

Siti Nur Endah, 2019

ANALISA EKSPRESI GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN GURAME (OSPHRONEMUS GOURAMY) YANG DIBERI PAKAN CAMPURAN TEPUNG SPIRULINA PLANTESIS DENGAN PAPARAN SUHU 20°C

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