

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan variabel mandiri, baik hanya pada satu variabel atau lebih (Sugiyono, 2017).

1.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia pada bulan Februari 2020 hingga Maret 2020. Proses sikuensing sampel menggunakan *Next Generation Sequencing* dilakukan di Novogene, Singapura.

1.3. 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.

1.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Tahap Persiapan

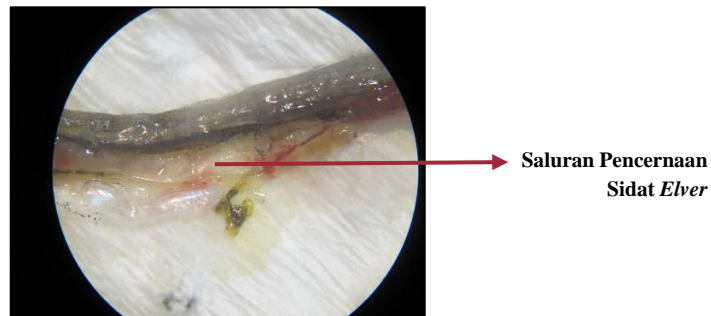
Alat dan bahan yang akan digunakan di Laboratorium Riset FPMIPA, UPI disiapkan dan disterilisasi terlebih dahulu dengan cara sterilisasi panas basah menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15-20 menit (Lampiran 2).

3.4.2. Tahap Penelitian

3.4.2.1. Pembedahan Ikan Sidat

Ikan sidat fase *elver* diambil 50 ekor di tempat budidaya ikan sidat yang berlokasi di Desa Giri Mekar, Bandung. Ikan sidat dibelah dan dibedah menggunakan pisau bedah. Pembedahan ikan sidat *elver* dilakukan untuk mendapatkan sampel saluran pencernaan dari esofagus sampai ujung anus hingga

mencapai 100 mg atau 0,1 gr. Adapun gambar pada saat pembedahan organ saluran pencernaan sidat *elver* yang terdapat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Pembedahan Saluran Pencernaan Ikan Sidat *Elver*

3.4.2.2. Isolasi DNA Bakteri pada Saluran Pencernaan Ikan Sidat

Isolasi DNA menggunakan metode Sambrook protokol (Sambrook *et al.*, 1989) dengan beberapa modifikasi. Tahap isolasi DNA diawali dengan penimbangan sampel saluran pencernaan sebesar 100 mg. Sampel yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* berukuran 1,5 ml yang berisi 500 μ l buffer lisis (50 mM Tris-HCl pH 8. 0, 50 mM EDTA, 1% SDS, dan 50 mM NaCl). Kemudian sampel yang berada dalam *tube* dihaluskan menggunakan *micropestle* steril. Saat tahap penghalusan sampel dilakukan, terjadi penghancuran sel pada saluran pencernaan sidat *elver*, baik secara fisik ataupun kimiawi. Penghancuran sel secara fisika yaitu dengan cara menggerus sampel saluran pencernaan ikan sidat *elver* sedangkan untuk penghancuran sel secara kimiawi digunakan penambahan buffer lisis. Sampel yang telah dihaluskan selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 13000 rpm. Supernatan yang didapatkan lalu dipindahkan ke dalam *tube eppendorf* baru sebanyak 500 μ l. Kemudian ditambahkan NaCl 5M sebanyak 300 μ l ke dalam *tube* tersebut. Sampel disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 13000 rpm. Setelah itu, supernatan diambil sebanyak 500 μ l dan dipindahkan ke dalam *tube eppendorf* 1,5 ml baru lalu ditambahkan isopropanol sebanyak volume supernatan yang telah diambil. Selanjutnya, sampel dihomogenkan menggunakan vortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang dengan hati-hati agar *pellet* tidak terbuang, kemudian *pellet* dicuci dengan 750 μ l Etanol 70%. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Etanol dibuang dan dikeringkan

dalam posisi terbalik diatas tisu steril. *Pellet* DNA yang didapat lalu dilarutkan dengan TE buffer 1X sebanyak 50 µl dan disimpan pada suhu -20°C. Pada tahap akhir isolasi DNA, pemberian buffer TE 1x digunakan untuk melarutkan DNA dan mencegah DNA dari degradasi selama penyimpanan.

3.4.2.3. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif DNA

Sampel hasil isolasi DNA yang didapatkan kemudian dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis DNA secara kualitatif digunakan metode elektroforesis gel agarosa. Elektroforesis merupakan suatu istilah yang menggambarkan migrasi dan pemisahan partikel bermuatan (ion) di bawah pengaruh medan listrik. Sistem elektroforesis terdiri dari dua elektroda dengan muatan berlawanan (anoda dan katoda) yang dihubungkan dengan media konduktor yang disebut elektrolit. Efek pemisahan pada partikel ionik dihasilkan dari perbedaan kecepatan (v), yang merupakan hasil kali mobilitas partikel (m) dan kekuatan medan (E) (Fritsch & Krause, 2003). Menurut Koontz (2013), molekul DNA memiliki muatan negatif sehingga molekul DNA akan bergerak melalui matriks agarosa dalam medan listrik menuju kutub positif. Asam nukleat yang lebih pendek akan lebih cepat bermigrasi melalui matriks daripada asam nukleat yang lebih besar selama periode waktu tertentu. Analisis kualitatif dilakukan pada gel agarose 1%. Pembuatan gel agarose dibuat dengan cara menimbang agarose sebanyak 1 gr kemudian dilarutkan dengan 30 ml Tris base, *acetic acid* dan EDTA (TAE) 1X. Gel agarose lalu dihomogenkan dengan menggunakan *microwave* hingga agarose larut dengan menggunakan botol *Duran*. Larutan yang sudah larut didiamkan hingga hangat kuku kemudian ditambahkan 1µl pewarna PeqGreen. PeqGreen tersebut berfungsi sebagai zat pewarna yang akan mewarnai DNA. Selanjutnya, gel agarosa dicetak menggunakan cetakan khusus dan ditunggu sampai padat. Gel agarosa yang telah padat dimasukkan ke dalam alat elektroforesis dan ditambahkan TAE 1X hingga gel agarose terendam. DNA *ladder* dimasukkan ke dalam sumur gel agarose pertama sebanyak 1 µl. *Ladder* tersebut digunakan untuk menentukan ukuran fragmen DNA (Lan *et al.*, 2012). Sumur selanjutnya diisi dengan sampel DNA sebanyak 5 µl dan dicampurkan dengan 1 µl *loading dye*. *Loading dye* berfungsi sebagai penanda laju migrasi serta sebagai pemberat supaya DNA berada di

bawah sumur. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan pada tegangan 100V selama 40 menit. Gel agarosa yang telah dielektroforesis dilihat hasilnya pada *UV-Transiluminator*.

Analisis DNA secara kuantitatif dilakukan dengan cara menghitung absorbansi DNA yang diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer yang bertujuan untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA. Panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm untuk melihat kemurnian DNA. Sebanyak 500 μ l ddH₂O dimasukkan ke dalam kuvet dan dicek absorbansinya menggunakan spektrofotometer sebagai larutan *blanco*. Larutan *blanco* dibuang dan dibersihkan menggunakan alkohol 70%, kemudian dibilas menggunakan ddH₂O. Sampel DNA yang akan dicek, terlebih dahulu dilakukan pengenceran sebanyak 100x. Pengenceran tersebut dilakukan dengan cara memasukkan 5 μ l sampel dan 495 μ l ddH₂O ke dalam *tube eppendorf* 1,5 ml. Sampel dihomogenkan menggunakan vortex kemudian dipindahkan ke dalam kuvet dan dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Spektrofotometer dilakukan *running* dan hasil akan muncul pada layar. Tingkat kemurnian DNA dinyatakan baik jika *Optical Density* (OD) 260/280 bernilai 1.8-2.0 (Sambrook *et al.*, 1989). Kemurnian DNA dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus:

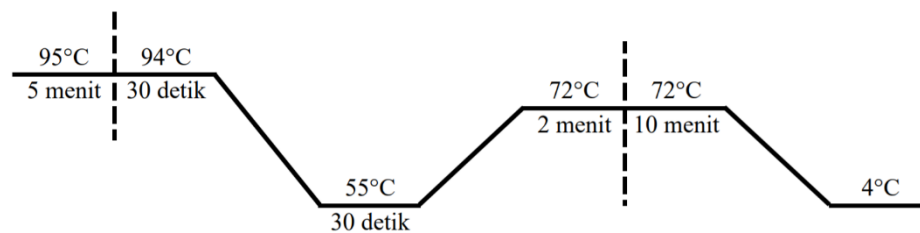
$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

3.4.2.4. Amplifikasi DNA

Teknik amplifikasi PCR memiliki tiga langkah utama yang terlibat di dalamnya, yaitu *denaturation*, *annealing* dan *extension* (Verma *et al.*, 2014). Amplifikasi digunakan primer dari gen 16S rRNA dengan Primer Bac27F *forward* (5-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3) dan primer Univ1492R *reverse* (5-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3) (Jiang *et al.*, 2006). Campuran reaksi untuk amplifikasi gen 16S rRNA ini sebanyak 10 μ l yang mengandung master mix, sebagai berikut: 5 μ l *GoTaq Green PCR Master Mix 2X*, 1 μ l mix DNA atau DNA *Template*, 0,5 μ l *Primer Forward*, 0,5 *Primer Reverse* dan 3 μ l ddH₂O (Protocol *GoTaq Green Master Mix*, 2016). Komposisi tersebut dimasukkan ke

dalam tabung PCR lalu disimpan ke dalam mesin PCR dan di program sebagai berikut: pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit; denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik; *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik; ekstensi awal pada suhu 72°C selama 2 menit; ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit (Jiang *et al.*, 2006).

Tahap denaturasi disebut juga dengan peleburan atau *melting*. Tahapan ini berlangsung pada suhu 95°C. Kadri (2020) menyatakan bahwa ikatan hidrogen DNA akan terputus dan menjadi ikatan tunggal pada tahap denaturasi. Proses setelah denaturasi dinamakan tahap *annealing* atau penempelan dimana primer menempel pada bagian DNA *template* yang komplementer urutan basanya, dan penempelan ini bersifat spesifik. Tahap ini dilakukan pada suhu 55°C selama 30 detik. Menurut Asy'ari & Noer (2005) spesifitas dan sensitifitas produk PCR bergantung pada kondisi optimal dari suhu *annealing*. Tahap *extension* atau pemanjangan dilakukan pada suhu 72°C, dimana DNA polymerase akan memanjangkan dan membentuk DNA baru.



Gambar 3.2. Kondisi PCR Amplifikasi 16S rRNA

Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada agarose 2% yang telah ditambahkan PeqGreen. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit dengan tegangan 80 volt pada larutan TAE 1X. Hasil elektroforesis dilihat di *UV Transilluminator*.

3.4.2.5. Sikuensing

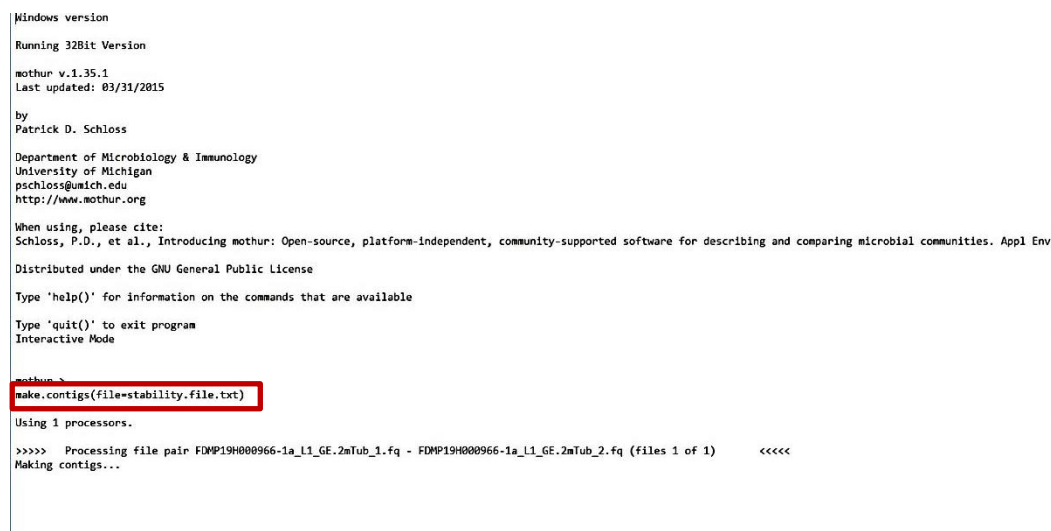
Sampel DNA yang telah diuji hasilnya dengan elektroforesis dan spektrofotometer dikirim ke Novogene, Singapura untuk dilakukan sikuensing. Sampel yang diterima oleh Novogene dilakukan ekstraksi DNA dari hasil isolasi lalu dilakukan amplifikasi menggunakan PCR. Produk PCR selanjutnya dikuantifikasi dan dikualifikasi, kemudian dicampurkan dan dipurifikasi. Hasil

purifikasi PCR dilanjutkan *library preparation* dan dilakukan sikuensing (Novogene, 2018).

3.4.3. Tahap Analisis Data

3.4.3.1. Pengolahan Data Hasil Sikuensing

Data hasil sikuensing berupa *fastq* dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak Mothur versi 1.35.1. Hal pertama yang dilakukan adalah menggabungkan dua set bacaan (*forward* dan *reverse*) dari sampel. Tahap penggabungan *forward* dan *reverse* akan mengekstrak data urutan dan skor kualitas dari file *fastq*. Data yang akan digabung menggunakan perintah *make.contigs* sebagaimana pada Gambar 3.3. *Contig* dapat didefinisikan sebagai rekonstruksi dari serangkaian bagian DNA yang saling tumpang tindih, dengan perintah tersebut serangkaian DNA dapat dirakit kembali ke dalam satu bentuk. Hasil *contig* tersebut dapat disimpan dalam format FASTA. Sementara itu, penggunaan perintah *summary.seqs* digunakan untuk mengetahui *output* atau hasil yang telah diproses.



```

Windows version
Running 32Bit Version
mothur v.1.35.1
Last updated: 03/31/2015

by
Patrick D. Schloss

Department of Microbiology & Immunology
University of Michigan
pschloss@umich.edu
http://www.mothur.org

When using, please cite:
Schloss, P.D., et al., Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Env
Distributed under the GNU General Public License

Type 'help()' for information on the commands that are available
Type 'quit()' to exit program
Interactive Mode

mothur >
make.contigs(file=stability.file.txt)
Using 1 processors.
>>>> Processing file pair FDMF19H000966-1a_L1_GE.2mTub_1.fq - FDMF19H000966-1a_L1_GE.2mTub_2.fq (files 1 of 1) <<<<
Making contigs...

```

Gambar 3.3. Penggabungan Dua Set Bacaan (*forward* dan *reverse*)

Sikuen yang telah dilakukan penggabungan kemudian dilakukan perintah *screen.seqs* dan selanjutnya dilakukan perintah *count.seqs* untuk mengetahui sikuen yang dihasilkan. Sikuen yang memiliki duplikat satu sama lain akan diurutkan menggunakan perintah *unique.seqs* untuk mendapatkan sikuen unik (Gambar 3.4).

```

mothur >
screen.seqs(minlength=400, maxambig=0, maxhomop=8)
Using stability.file.trim.contigs.good.fasta as input file for the fasta parameter.

Using 1 processors.

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.fasta
stability.file.trim.contigs.bad.accnos

It took 4 secs to screen 68832 sequences.

mothur >
summary.seqs()
Using stability.file.trim.contigs.good.fasta as input file for the fasta parameter.

Using 1 processors.

      Start  End  NBases  Ambigs  Polymer  NumSeqs
Minimum:    1   401    401     0        3         1
2.5%-tile:  1   404    404     0        4       1542
25%-tile:   1   404    404     0        5      15418
Median:     1   429    429     0        6     30836
75%-tile:   1   429    429     0        6     46254
97.5%-tile: 1   430    430     0        6     60130
Maximum:    1   453    453     0        8     61671
Mean:      1  420.879  420.879  0     5.55911
# of Seqs: 61671

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.summary

It took 1 secs to summarize 61671 sequences.

mothur >
unique.seqs()
Using stability.file.trim.contigs.good.fasta as input file for the fasta parameter.
61671 15732

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.names
stability.file.trim.contigs.good.unique.fasta

mothur >
count.seqs()
Using stability.file.trim.contigs.good.names as input file for the name parameter.

Using 1 processors.
It took 0 secs to create a table for 61671 sequences.

```

Gambar 3.4. Pengurutan Sikuen Unik

Selanjutnya sikuen disejajarkan menggunakan referensi SILVA versi 132. Perintah untuk mensejajarkan yang digunakan adalah *align.seqs* (Gambar 3.5). Proses penjajaran tersebut dapat membandingkan dan mendeteksi kesamaan antara sikuen. Sikuen yang telah disejajarkan difilter dengan menggunakan perintah *filter.seqs* kemudian dilakukan perintah *unique.seqs* kembali.

```

mothur >
align.seqs(reference=silva.nr_v132.align)
Using stability.file.trim.contigs.good.unique.fasta as input file for the fasta parameter.

Using 1 processors.

Reading in the silva.nr_v132.align template sequences...      DONE.
It took 242 to read 213119 sequences.
Aligning sequences from stability.file.trim.contigs.good.unique.fasta ...
Some of you sequences generated alignments that eliminated too many bases, a list is provided in stability.file.trim.contigs.good.unique.flip.accnos. If
It took 392 secs to align 15732 sequences.

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.unique.align
stability.file.trim.contigs.good.unique.align.report
stability.file.trim.contigs.good.unique.flip.accnos

mothur >
summary.seqs()
Using stability.file.trim.contigs.good.unique.align as input file for the fasta parameter.

Using 1 processors.
[WARNING]: This command can take a namefile and you did not provide one. The current namefile is stability.file.trim.contigs.good.names which seems to ma

      Start  End  NBases  Ambigs  Polymer  NumSeqs
Minimum:   -1   -1     0        0        1         1
2.5%-tile: 6428  23444  13        0        2        394
25%-tile:  6428  23444  404        0        5       3934
Median:    6428  23444  429        0        6       7867
75%-tile:  6428  23444  429        0        6      11800
97.5%-tile: 7807  23444  430        0        6      15339
Maximum:   43116 43116  450        0        8      15732
Mean:     7168.38 23668.5 409.819 0     5.40173
# of Seqs: 15732

```

```

mothur >
filter_seqs(vertical=T, trump=.)
Using stability.file.trim.contigs.good.unique.good.align as input file for the fasta parameter.
Using 1 processors.
Creating Filter...

Running Filter...

Length of filtered alignment: 774
Number of columns removed: 49224
Length of the original alignment: 50000
Number of sequences used to construct filter: 15057

Output File Names:
stability.filter
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.fasta

mothur >
unique_seqs()
Using stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.fasta as input file for the fasta parameter.
[WARNING]: This command can take a namefile and you did not provide one. The current namefile is stability.file.trim.contigs.good.names which seems to match stability.
15057 15054

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.names
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.fasta

```

Gambar 3.5. Pejajaran Sikuen

Setelah disejajarkan, langkah selanjutnya adalah *pre-cluster*. *Pre-cluster* dapat mengurangi kesalahan urutan dan jumlah sikuen unik (Schloss *et al.*, 2011). Pada umumnya, amplifikasi menghasilkan urutan *chimeric* atau chimera yang berasal dari dua atau lebih urutan asli. Menurut Edgar *et al.*, (2011) chimera yang tidak terdeteksi dapat disalahartikan sebagai spesies atau taksa baru. Hal tersebut dapat menyebabkan peningkatan keragaman dan menyebabkan kesimpulan yang kurang tepat tentang perbedaan antar populasi. Oleh karena itu, chimera perlu dideteksi dan dihapus keberadaannya. Perhitungan tingkat kesalahan sikuensing dan identifikasi berdasarkan chimera dapat dijalankan dengan perintah *chimera.uchime* dengan *file* hitung akan menghapus urutan chimera dari *file* yang dihitung. Meskipun chimera telah dihapus, namun masih perlu menghapus urutan tersebut dari *file* FASTA yang telah didapatkan dari tahap sebelumnya (*pre-cluster*) dengan perintah *remove_seqs* (Gambar 3.6).


```

mothur >
pre.cluster(diffs=2)
Using stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.fasta as input file for the fasta parameter.

Using 1 processors.
[WARNING]: This command can take a namefile and you did not provide one. The current namefile is stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.name
15054 6837 8217
Total number of sequences before precluster was 15054.
pre.cluster removed 8217 sequences.

It took 13 secs to cluster 15054 sequences.

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.names
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.map

mothur >
chimera.uchime(reference=silva.gold.align)
Using stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta as input file for the fasta parameter.

Using 1 processors.

uchime by Robert C. Edgar
http://drives.com/uchime
This code is donated to the public domain.

Checking sequences from stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta ...

It took 1551 secs to check 6837 sequences. 1256 chimeras were found.

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.chimeras
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.accnos

mothur >
remove.seqs(fasta=stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta, accnos=stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter
[WARNING]: This command can take a namefile and you did not provide one. The current namefile is stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.uniq
Removed 1256 sequences from your fasta file.

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta

```

Gambar 3.6. Precluster dan Penghapusan Chimera

Sikuen diklasifikasikan menggunakan pengelompokan Bayesian dengan perintah *classify.seqs*. Setelah itu, dilakukan perintah *remove.lineage* (Gambar 3.7) sebagai langkah kontrol kualitas akhir untuk menghapus bagian selain komunitas bakteri yaitu komunitas Archaea, kloroplas, mitokondria, eukaryota dan komunitas yang tidak diketahui.

```

mothur:1587964147 - Notepad
File Edit Format View Help

mothur >
classify.seqs(fasta=stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta, count=stability.file.trim.contigs.good.unique.good
Unable to open stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.count_table. It will be disregarded.

Using 1 processors.
[WARNING]: This command can take a namefile and you did not provide one. The current namefile is stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.uniq
Generating search database... DONE.
It took 402 seconds generate search database.

Reading in the silva.nr_v132.tax taxonomy... DONE.
Calculating template taxonomy tree... DONE.
Calculating template probabilities... DONE.
It took 665 seconds get probabilities.
Classifying sequences from stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta ...
[WARNING]: A00821_122_HCVSHDRXX_2_2143_31801_32769 could not be classified. You can use the remove.lineage command with taxon-unknown; to remove such seq

It took 331 secs to classify 5581 sequences.

It took 0 secs to create the summary file for 5581 sequences.

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.nr_v132.wang.taxonomy
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.nr_v132.wang.tax.summary

mothur >
remove.lineage(fasta=stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta, count=stability.file.trim.contigs.good.unique.good
Using stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.nr_v132.wang.taxonomy as input file for the taxonomy parameter.

[NOTE]: The count file should contain only unique names, so mothur assumes your fasta, list and taxonomy files also contain only uniques.

Output File Names:
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.nr_v132.wang.pick.taxonomy
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.fasta
stability.file.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.count_table

```

Gambar 3.7. Klasifikasi Sikuen

Keterangan :

H' = Indeks keanekaragaman

p_i = n_i/N

n_i = Jumlah individu jenis ke- i

N = Jumlah total individu

Kisaran nilai indeks keanekaragaman dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

$H' > 3$: Keanekaragaman spesies tinggi

$1 \leq H' \leq 3$: Keanekaragaman spesies sedang

$H' < 1$: Keanekaragaman spesies rendah

Indeks Simpson (D) adalah indeks keanekaragaman hayati yang menimbang spesies dominan dan umum ditemukan dalam sampel (Simpson, 1949; Lemos *et al.*, 2011). Spesies maupun taksa yang langka atau minor dengan beberapa individu tidak mempengaruhi nilai indeks keanekaragaman hayati ini. Rumus indeks keanekaragaman Simpson:

$$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$$

Keterangan :

s = Jumlah total spesies dalam komunitas

P_i = n_i/N

n_i = Jumlah individu jenis ke- i

N = Jumlah total individu

Indeks dominansi digunakan untuk mengetahui sejauh mana suatu taksa mendominasi kelompok lain. Semakin besar nilai indeks dominansi, maka semakin besar pula adanya jenis tertentu yang mendominasi. Indeks dominansi dihitung menggunakan Indeks Dominansi Simpson (Odum, 1993) dengan rumus sebagai berikut.

$$C = - \sum [n_i/N]^2$$

Keterangan :

C = Indeks dominansi Simpson

n_i = Jumlah individu jenis ke-i

N = Jumlah total individu

Kisaran nilai indeks dominansi adalah sebagai berikut:

$0,00 < C < 0,30$: Dominansi rendah

$0,30 < C < 0,60$: Dominansi sedang

$0,60 < C < 1,00$: Dominansi tinggi

Indeks keseragaman dihitung dengan menggunakan rumus indeks *evenness* Buzas dan Gibson (1969). Kriteria kisaran nilai indeks keseragaman Buzas dan Gibson adalah diantara nilai nol dan kurang dari sama dengan satu ($0 < E \leq 1$). Rumus *evenness* Buzas dan Gibson dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$E = \frac{e^H}{S}$$

Keterangan:

E = Indeks keseragaman Buzas dan Gibson

e = Logaritma dasar

H = Indeks keanekaragaman

S = Jumlah taksa

Indeks kekayaan dapat dihitung dengan menggunakan rumus yang diadopsi dari Margalef (1958):

$$R = \frac{S - 1}{\ln(n)}$$

Keterangan:

R = Indeks kekayaan taksa

S = jumlah total taksa dalam suatu habitat

n = jumlah total individu dalam suatu habitat

Kriteria kisaran nilai indeks kekayaan adalah sebagai berikut:

- $R < 2,5$: Kekayaan jenis rendah
 $2,5 > R > 4$: Kekayaan jenis sedang
 $R > 4$: Kekayaan jenis tinggi

Ekuitabilitas J dapat dihitung dengan membagi keanekaragaman Shannon-Wiener dengan logaritma jumlah taksa (Pielou, 1966). Pengukuran kesetaraan ini membandingkan indeks Shannon-Wiener yang diamati dengan distribusi individu antara spesies yang diamati yang akan memaksimalkan keanekaragaman. Indeks keanekaragaman dapat mengambil nilai maksimum yang sama dengan $\log(S)$. H_{max} adalah nilai maksimum teoritis untuk $H(s)$ ketika semua spesies dalam sampel sama-sama melimpah. Ekuitabilitas J memiliki kisaran nilai antara nol dan satu, dengan nilai satu mewakili komposisi spesies yang sangat seimbang (kemerataan lengkap). Rumus Ekuitabilitas J dinyatakan sebagai berikut:

$$J = \frac{H'}{\log(S)}$$

Keterangan :

- J = Indeks Ekuitabilitas
 H' = Indeks keanekaragaman Shannon Wiener
 S = Total taksa dalam suatu habitat

Chao1 merupakan metode nonparametrik untuk memperkirakan jumlah spesies dalam suatu komunitas. Metode ini dikembangkan oleh Anne Chao dan didasarkan pada konsep bahwa spesies langka menyimpulkan informasi paling banyak tentang jumlah spesies yang hilang. Chao memberikan bobot lebih untuk spesies yang memiliki kelimpahan rendah. *Singletons* dan *doubletons* yang digunakan untuk mengestimasi jumlah spesies yang hilang (Chao, 1984). Rumus Chao1 adalah sebagai berikut:

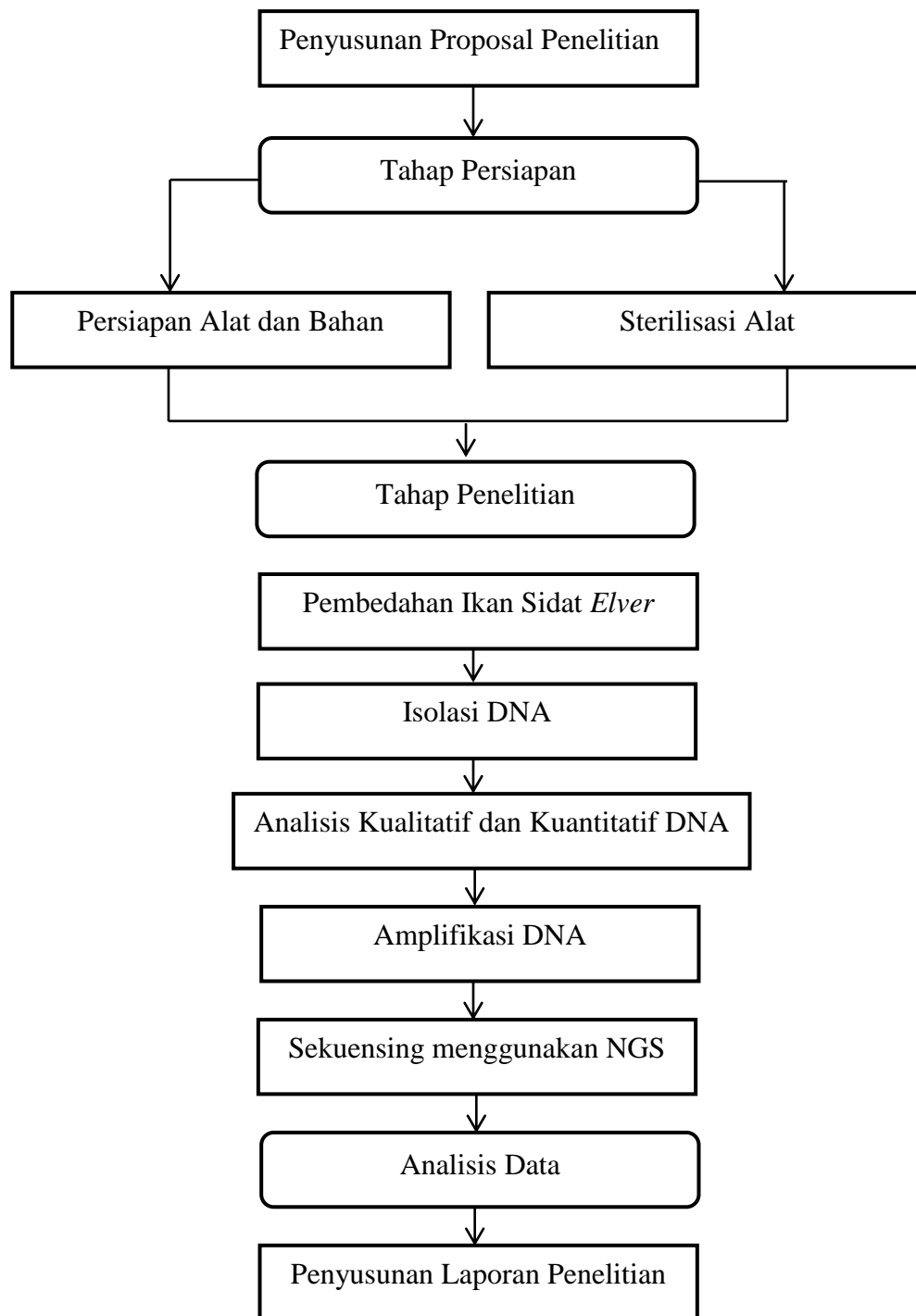
$$S_{chao1} = S_{obs} \frac{F_1 (F_1 - 1)}{2 (F_2 + 1)}$$

Keterangan :

- S_{obs} = Jumlah spesies atau taksa yang diobservasi
 F_1 = Spesies yang muncul satu kali dalam total spesies (*Singletons*)
 F_2 = Spesies yang muncul dua kali dalam total spesies (*Doubletons*)

3.5. Alur Penelitian

Secara garis besar tahapan pada penelitian terbagi menjadi tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap analisis data. Pada tahap persiapan dilakukan sterilisasi alat dan pembuatan larutan stok. Selanjutnya, dilakukan pembedahan ikan sidat *elver*. Kemudian dilakukan isolasi DNA pada saluran pencernaan ikan sidat *elver*. Isolat DNA yang didapatkan dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif kemudian dilakukan amplifikasi DNA. Hasil amplifikasi disekuensing menggunakan NGS di Novogene, Singapura. Setelah itu, dilakukan analisis terhadap hasil sikuensing (Gambar 3.10).



Gambar 3.10. Bagan Alur Penelitian